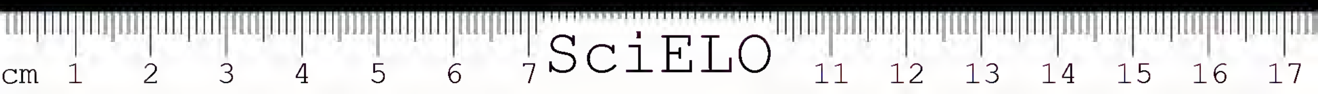
# MEMÓRIAS INSTITUTO BUTANTAN

1974

VOLUME 38

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DOS SERVIÇOS TÉCNICOS ESPECIALIZADOS
INSTITUTO BUTANTAN
SÃO PAULO — BRASIL




cm 1 2 3 4 5 6
SciELO
10 11 12 13 14 15 16

# MEMÓRIAS
# DO
# INSTITUTO BUTANTAN





Serão fornecidas separatas dos trabalhos publicados nas "MEMÓRIAS DO INSTITUTO BUTANTAN", solicitando-se nesse caso o obséquio de enviar outras separatas, em permuta, para a Biblioteca do Instituto.

Toda a correspondência editorial deve ser dirigida ao:


INSTITUTO BUTANTAN
Biblioteca
Caixa Postal 65
05504 — São Paulo — BRASIL


EXCHANGED DESIRED
PEDE-SE PERMUTA

INSTITUTO BUTANTAN

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
*Secretário* — Dr. Getulio Lima Junior

COORDENADORIA DE SERVIÇOS TÉCNICOS ESPECIALIZADOS
*Coordenador* — Prof. Dr. Otto Guilherme Bier

INSTITUTO BUTANTAN — DIRETORIA GERAL
*Diretora* — Dra. Jandyra Planet do Amaral

I — DIVISÃO DE MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA

Diretor — *Dr. Bruno Soerensen Cardozo*

a) *Serviço de Imunologia*
Diretor — Dr. Raymundo Rolim Rosa

b) *Serviço de Virologia*
Diretor — Dr. René Correa

II — DIVISÃO DE BIOLOGIA

Diretor — *Dr. Alphonse Richard Hoge*

a) *Serviço de Animais Peçonhentos*
Diretor — Dr. Hélio Emerson Belluomini

b) *Serviço de Genética*
Diretor — Dr. Willy Beçak

III — DIVISÃO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS E QUÍMICA

Diretor — *Dra. Alba Apparecida de Campos Lavras*

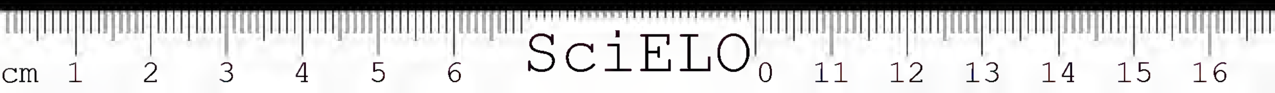
a) *Serviço de Bioquímica*
*Diretor* — Dra. Fajga Ruchla Mandelbaum

b) *Serviço de Farmacologia*
Diretor — Dra. Mina Fichman

c) *Serviço de Fisiologia*
Diretor — Dr. Saul Schenberg

d) *Serviço de Química Orgânica*
Diretor — Dr. Raymond Zelnik





IV — DIVISÃO DE PATOLOGIA

Diretor — *Dr. Jesus Carlos Machado*

a) *Serviço de Fisiopatologia*
Diretor — Dra. Linda Nahas

*Serviços Diretamente Ligados à Diretoria Geral*

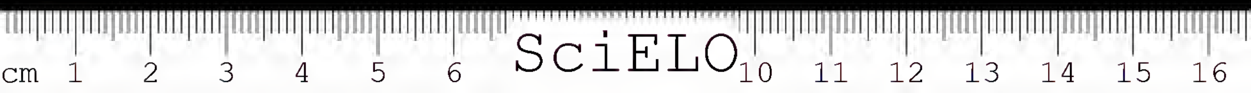
a) *Serviço Agrícola*
Diretor — Dr. Feres Saliba

LABORATÓRIOS ESPECIAIS:

*Laboratório Especial de Imuno-Biologia*
Diretor — Dr. Wilmar Dias da Silva

*Centro OMS/OPS de Pesquisa e Formação em Imunologia*
Diretor — Dr. Ivan Motta





# INSTRUÇÕES AOS AUTORES

## 1 — *FINALIDADE*

As MEMÓRIAS DO INSTITUTO BUTANTAN são publicadas sob a orientação da Comissão Editorial, sendo que os conceitos emitidos são de inteira responsabilidade dos autores. Tem por finalidade a apresentação de trabalhos originais que contribuam para o progresso nos campos da Biologia e da Medicina, elaborados por especialistas nacionais ou estrangeiros que se enquadrem no REGULAMENTO DOS TRABALHOS.

## 2 — *REGULAMENTO DOS TRABALHOS*

### 2.1 — *NORMAS GERAIS*

2.1.1 Os trabalhos devem ser inéditos e destinar-se exclusivamente à revista "MEMÓRIAS DO INSTITUTO BUTANTAN". Os artigos serão publicados a convite da Comissão Editorial.

2.1.2 *ESTRUTURA DO TRABALHO*

2.1.2.1 *Elementos preliminares*

a) cabeçalho — título do trabalho e nome do autor (es);
b) filiação científica e endereço para correspondência.

2.1.2.2 *Texto*

Sempre que possível deve obedecer à forma convencional do artigo científico:

a) *Introdução* — Estabelecer com clareza o objetivo do trabalho, relacionando-o com outros do mesmo campo e apresentando de forma sucinta a situação que se encontra o problema investigado. Extensas revisões de literatura devem ser substituídas por referências aos trabalhos mais recentes, onde tais revisões tenham sido apresentadas.

b) *Material e métodos* — A descrição dos métodos usados deve limitar-se ao suficiente para possibilitar ao leitor a perfeita compreensão e repetição dos métodos; as técnicas já descritas em outros trabalhos devem ser referidas somente por citação, a menos que tenham sido consideravelmente modificadas.

c) *Resultados* — Devem ser apresentados com clareza e, sempre que necessário, acompanhados de tabelas e material ilustrativo adequado.





d) *Discussão* — Deve restringir-se à apresentação dos dados obtidos e dos resultados alcançados, relacionando-se novas contribuições aos conhecimentos anteriores. Evitar hipóteses ou generalizações não baseadas nos resultados do trabalho.

e) *Conclusões* — devem ser fundamentadas no texto.

Dependendo do assunto do artigo, as divisões acima poderão ser modificadas de acordo com o esquema de trabalho, porém, o artigo deve conter obrigatoriamente:

a) *Introdução;*

b) Desenvolvimento do tema (com as divisões a critério do autor);

c) Conclusão.

*Agradecimentos* — devem ser mencionados antes das *Referências Bibliográficas.*

2.1.2.3 *Material de Referência*

Todo trabalho deve vir obrigatoriamente acompanhado de:

a) *RESUMO* — um no mesmo idioma do texto, outro em inglês, redigidos pelo(s) próprio(s) autor(es), devem expressar o conteúdo do artigo, salientando os elementos novos e indicando sua importância. O resumo na língua em que está redigido o trabalho deve ser colocado antes do texto; e o em inglês no final. Só excepcionalmente excederá a 200 palavras. Os títulos dos trabalhos devem ser traduzidos para o inglês e vice-versa.

b) *UNITERMOS* — Correspondendo a palavras ou expressões que identifiquem o conteúdo, devem ser em número necessário para a completa descrição do assunto e assinalados com asterísticos os 3 unitermos principais. Para escolha dos unitermos usar o vocabulário protótipo do campo especializado. (*)

c) *REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS* — Devem ser incluídas apenas as referências mencionadas no texto e arranjadas em ordem alfabética do sobrenome do autor, numeradas consecutivamente.

Periódico:

AMORIM, M. de F., MELLO, R. F. e SALIBA, F. — Envenenamento botrópico e crotálico. Contribuição para o estudo experimental comparado das lesões. *Mem. Inst. Butantan, 23*:63, 1950-51.

---

*Livros*

BIER, O. — Bacteriologia e imunologia, 1, 13, ed.

Melhoramentos, São Paulo, 1966.

As citações no texto devem ser em números índices, correspondendo às respectivas referências bibliográficas.

Exemplos:

As investigações sobre a fauna flebotomínica no Estado de São Paulo, foram feitas em várias ocasiões [1, 3, 4].

... método derivado de simplificação de armadilha de Disney[2] (1968).

*Referências Bibliográficas* (correspondentes aos números índices)

1. BARRETO, M. P. — *Observações sobre a biologia em condições naturais dos flebótomos do Estado de São Paulo* (Diptera Psychodidae); São Paulo, 1943. (Tese — Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo).

2. DISNEY, R. H. L. — Observations on a zoonosis: leishmaniosis in British Honduras. *J. appl. Ecol., 5:19*, 1968.

3. FORATTINI, O. P. — Algumas observações sobre Biologia dos flebótomos (Diptera, Psychodidae) em região da bacia do Rio Paraná (Brasil). *Arq. Fac. Hig. S. Paulo, 8:*15-136, 1954.

3. FORATTINI, O. P. — Novas observações sobre Biologia de flebótomos em condições naturais (Diptera, Psychodidae). *Arq. Fac. Hig. S. Paulo*, 25:209-15, 1960.

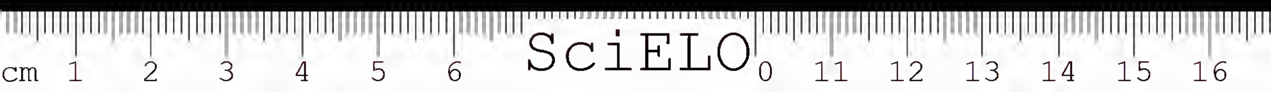
3 — *NORMAS PARA APRESENTAÇÃO DOS ORIGINAIS*

3.1 — *Datilografia* — Os originais devem ser datilografados, em 3 (três) vias, com espaço duplo, em uma só face, mantendo as margens laterais com 3 cm aproximadamente. Todas as páginas devem ser numeradas consecutivamente, com algarismos arábicos, no canto superior direito.

3.2 — *Tabelas* — devem ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos e encabeçadas pelo seu título. Os dados apresentados em tabela não devem ser, em geral, repetidos no texto. As notas de rodapé das tabelas devem ser restritas ao mínimo possível e referidas por asteriscos.

3.3 — *Ilustrações* — (fotografias, desenhos, gráficos, etc.) — As ilustrações devem ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos e citadas como Figuras. Todas as figuras serão identificadas fora da área de reprodução com: número, nome do autor, título abreviado do trabalho, indicação da página de texto onde deverão constar. As legendas devem ser apresentadas em folhas à parte. As ilustrações devem permitir perfeita repro-





dução em clichês até a redução mínima de 6,3 cm. Os desenhos devem ser feitos em papel vegetal e tinta nanquim preta e as letras com normógrafo, nunca datilografadas.

A Revista admite clichês (branco e preto) até 6 no texto, para cada trabalho, devendo os demais ser pagos pelo autor. Para clichês coloridos deverá haver prévia combinação entre a Comissão Editorial e o autor.

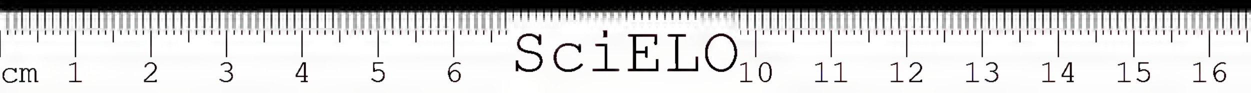
De cada trabalho serão tiradas 100 (cem) separatas, devendo o autor pagar as separatas que excedam a esse número, quando solicitar uma quantidade maior. As separatas em excesso devem ser solicitadas quando o manuscrito for encaminhado à Comissão Editorial.

Os trabalhos poderão ser redigidos, além da língua portuguesa, em: inglês, francês e espanhol. Outras línguas ficarão a critério da comissão Editorial.

A reprodução total ou parcial dos trabalhos em outros periódicos — *com menção obrigatória da fonte* — dependerá de autorização prévia da Comissão Editorial.

Para fins comerciais, será proibida a tradução e reprodução dos trabalhos publicados pela revista.





## CONTEÚDO

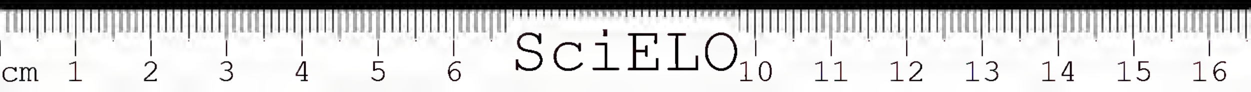
pág.

*Artigos originais / Original Articles*

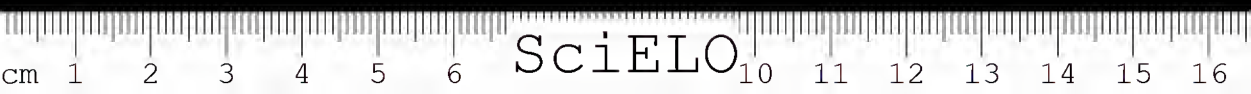









cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 0 11 12 13 14 15 16


cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15 16

Mem. Inst. Butantan
38: 1-12, 1974

# VIRULENCIA Y MULTIRRESISTENCIA A DROGAS DE CEPAS EPIDEMICAS DE *S. TYPHIMURIUM* AISLADAS EN HOSPITALES INFANTILES DE SUDAMERICA.

## I) VIRULENCIA COMPARATIVA PARA EL RATON DE CEPAS EPIDEMICAS Y NO EPIDEMICAS DE *S. typhimurium*. —

C. A. PELUFFO, KINUE IRINO Y SYLVIA MELLO

*RESUMEN* — Se estudia la virulencia para el ratón de una muestra de 26 cepas de *S. typhimurium* multirresistentes a drogas procedentes de brotes epidémicos ocurridos en 9 ciudades de 5 países sudamericanos (Argentina, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay), comparativamente con 16 cepas no epidémicas, sensibles.

La media aritmética de la DL 50 de las cepas epidémicas estudiadas fue de $8{,}92 \times 10^6$ y la de las sensibles de $2{,}84 \times 10^5$ ($P = <0{,}01, >0, 005$). Se dcstaca lo inesperado de este hallazgo así como su trascendencia para los estudios sobre patogenia de la infección salmonelósica y su prevención específica que se realizan usando al ratón como modelo experimental.

Se discute los factores que condicionan esta marcada diferencia de virulencia de las cepas epidémicas en el niño y el ratón así como el mecanismo responsable del cambio, señalando la importancia de ampliar nuestros conocimientos intensificando las investigaciones sistemáticas en ese campo.

*UNITERMINOS* — Virulencia comparativa para el ratón. *S. typhimurium:* Cepas epidemicas, multirresistentes a drogas. Cepas no epidemicas, sensibles.

A partir de 1970 han comenzado a producirse en Latinoamérica brotes de salmonelosis en hospitales infantiles causados por cepas multirresistentes de *S. typhimurium*. — Las características de las cepas responsables así como los aspectos clínicos y epidemiológicos tienen similitud con los señalados por Mata y colaboradores en los brotes causados por Shigella dysenteriae 1 en Centro América (20) así como con el brote de tifoidea de México (11).

La trasmisión interhumana de salmonelas y la posibilidad de que se produzcan brotes de salmonelosis en hospitales de niños fueron mencionados por Hormaeche y colaboradores (13, 15) desde el comienzo del estudio de la participación de estos agentes en patología infantil, constituyendo uno de los pilares en que se basó la "Doctrina de Montevideo". —

Los brotes eran sin embargo limitados, involucrando un corto número de niños en estrecho contacto entre sí y fácilmente controlables por la aplicación de normas elementaes de higiene hospitalaria (14).

La aparición de las cepas epidémicas multirresistentes tiene como consecuencia un cambio radical en el panorama epidemiológico, de morbilidad, de mortalidad y de algunos aspectos clínicos de las infecciones infantiles por enterobacterias.

A las infecciones esporádicas, con la característica distribución estacional, suceden brotes hospitalarios-aún en pleno invierno- afectando si-

Endereço para correspondência
C.P. 65 — 05504 — São Paulo — Brasil

multáneamente a un alto número de niños internados y extendiéndose rápidamente a todas las salas de un mismo hospital. — Los reingresos de lactantes infectados llevan al agente a otros hospitales donde el proceso se repite y luego a la comunidad donde se señalan casos por el mismo agente en niños sin contacto hospitalario.

Como consecuencia, la frecuencia relativa de los agentes de enteritis se modifica profundamente. — Las salmonelas pasan de una frecuencia de 3% a 5% en estadísticas previas (1,9) al 20-30%, (3,6,10,16,23,25) desplazando del primer lugar a *E. coli* enteropatógeno, sin que se modifique la frecuencia absoluta de éste.

La letalidad que había descendido por debajo del 5% luego de la creación de centros especializados de rehidratación con facilidades adecuadas de laboratorio y atención de enfermería, sube en forma vertical. — Al comienzo de los brotes, cuando aún no eran conocidas las peculiares características de las cepas involucradas la letalidad llega al 50% para mantenerse luego por encima del 20% (3,10). — Son frecuentes además los procesos generalizados, particularmente septicemias y meningitis (3,25).

Todos los indicadores indirectos de la excepcional virulencia de estas cepas para el niño están pues presentes; alta trasmisibilidad — lo que indica baja dosis infectante — elevada letalidad y frecuencia de la generalización del agente.

Los brotes epidémicos por salmonelas multirresistentes afectan a los hospitales infantiles de la mayoría de los países latinoamericanos y constituyen un importante problema de Salud Pública. — Siendo producidos por un tipo serológico único es posible intentar su control mediante el empleo de vacunas, particularmente si éstas pueden administrarse por vía oral.

Con la finalidad de obtener una vacuna eficaz es necesario disponer de mayor información sobre las características de las cepas productoras de brotes en diferentes regiones del Continente, que expliquen su comportamiento clínico y epidemiológico.

En esta primera etapa de ese estudio damos los resultados de la determinación de la virulencia para el ratón de esas cepas epidémicas, comparativamente con la de cepas sensibles a los antibióticos, aisladas contemporáneamente de animales o de niños, previamente a la producción de brotes asi como cepas estandar procedentes de colecciones. — Los resultados obtenidos justificam esta publicación ya que difieren sustancialmente de los anticipados.

*Materiales y métodos.*

*Cepas de S. typhimurium.* — Hemos obtenido una nuestra constituída por 84 cepas multirresistentes aisladas de brotes producidos en 9 ciudades de 5 países de Sud América y 28 cepas, no epidémicas, sensibles a los antibióticos, procedentes de sólo dos países.

No fué posible obtener una muestra de cepas sensibles más representativa y comparable con la anterior ya que en la actualidad todas las cepas aisladas de niños son resistentes y no se han conservado en colecciones cepas obtenidas en períodos anteriores. — Con fines de comparación se han estudiado cepas clásicas de colección de comportamiento conocido.

En el Cuadro 1 se resume el origen de las 26 cepas epidémicas y 16 sensibles de esa muestra, que han sido empleadas en esta etapa de estudio.

*Estudio de las cepas.* — Previamente a su empleo se realizó el estudio bioquímico y serológico de las cepas comprobando si poseían los caracteres de *S. typhimurium.* — Se aislaron además en placas de agar simple, se eligieron colonias morfológicamente lisas y se seleccionó, por la aglutinación con sueros somáticos y la reacción de Pampana, una colonia con todos los caracteres de las cepas "S". — No se utilizó ninguna cepa que diera aglutinación positiva con tripaflavina.

*Ratones* — Se utilizó una cepa de ratones blancos procedentes del criadero del Instituto Pasteur de San Pablo en los que se demostró, luego de una exaustiva investigación, que estaban libres de infección crónica por salmonelas. — Experiencias previas con ratones procedentes de otros cuatro criaderos demostraron que estaban infectados por *S. typhimurium* y/o *S. enteritidis* y que para excluir la infección no es suficiente realizar cultivos repetidos de materias fecales y/o bazo de animales de control.

De preferencia se utilizaron ratones machos de 18 a 22 grs. de peso; debido a la insuficiencia del suministro fué necesario utilizar hembras en algunas determinaciones después de demostrar en experiencias paralelas, que no existían diferencias significativas entre ambos ($X^2=0,17$; $P=0,7$).

*Preparación de inóculos* — Del cultivo en agar simple de 15 horas se preparan suspensiones de solución fisiológica tope pH 7,4 (S.T.); centrifugación a 1.000 × g., resuspensión en S.T y nueva centrifugación a 200 × g. durante 30 segundos, para eliminar acúmulos bacterianos.

Esta suspensión es ajustada a $5 \times 10^8$ en fotocolorímetro Leitz a 535 mu y a partir de esa suspensión madre se realiza en S.T la dilución apropiada para inocular.

*Recuento de viables* — Se utilizó una modificación de la técnica de Miles, Misra e Irwing (23) realizando diluciones en S.T a partir de la suspensión a $5 \times 10^8$, el día previo a la inoculación. Diluciones con una concentración aproximada de respectivamente 50 y 100 bacterias en 0,1 ml se gotean por triplicado en tres cajas de Petri con agar simple. Luego de incubación a 37°C, 24 horas, se realiza el recuento de colonias y se estima el número de viables de la suspensión madre calculándose el promedio de la lectura de las seis cajas. Periódicamente y como control se hizo un segundo recuento, practicando diluciones similares a partir de la dosis menor inoculada en los ratones.

## CUADRO 1

Origen de 26 cepas de *S. typhimurium* epidémicas y 16 sensibles a los antibióticos utilizadas en la determinación de la $DL_{50}$.

| EPIDÉMICAS | | | | SENSIBLES | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Cepa N.º | Aislada Ciudad | y año | Material | Cepa N.º | Aislada Ciudad | y año | Material |
| M 30/71 | Montevideo | 1971 | Heces | M 2 | Montevideo | 1971 | Ganglio suino |
| M 1/72 | Montevideo | 1972 | Sangre | M 9 | Montevideo | 1971 | Hígado ave |
| M 4/72 | Montevideo | 1972 | Pus antro | M 10 | Montevideo | 1971 | Hígado ave |
| M 59/72 | Montevideo | 1972 | Heces | M 94/72 | Montevideo | 1972 | Heces bovino |
| PV 1 | Montevideo | 1973 | Heces | M 96/73 | Montevideo | 1972 | Heces bovino |
| PV 4 | Montevideo | 1973 | Heces | M 173/73 | Montevideo | 1973 | Ganglio bovino |
| PV 13 | Montevideo | 1973 | Heces | M 177/73 | Montevideo | 1973 | Ganglio bovino |
| PV 26 | Montevideo | 1973 | Heces | Bu 2 | Butantan | 1973 | Bazo ratón |
| BA 208 | Buenos Aires | 1972 | Heces | CDC 9 | Colec. Int. de > | 40 años | |
| BA 706 | Buenos Aires | 1972 | L.C.R. | d 1397 | Montevideo | 1956 | Heces lact. |
| R 1753 | Rosario | 1972 | Heces | d 1425 | Montevideo | 1956 | Heces lact. |
| R 1796 | Rosario | 1972 | Heces | d 2461 | Montevideo | 1958 | Heces lact. |
| LP 2491 | La Plata | 1972 | Heces | d 2798 | Montevideo | 1960 | Heces lact. |
| LP 3051 | La Plata | 1972 | Heces | PE 367 | Peru | 1971 | Heces lact. |
| C 1 | Córdoba | 1972 | Heces | PE 368 | Peru | 1971 | Heces lact. |
| C 2 | Córdoba | 1972 | Heces | PE 369 | Peru | 1971 | Heces lact. |
| SP 1480 | São Paulo | 1973 | Heces | | | | |
| SP 1545 | São Paulo | 1973 | Heces | | | | |
| SP 1550 | São Paulo | 1973 | Heces | | | | |
| SP 1564 | São Paulo | 1973 | Heces | | | | |
| Rec 3 | Recife | 1973 | Heces | | | | |
| Rec 5 | Recife | 1973 | Heces | | | | |
| CH 3628 | Santiago | 1972 | Heces | | | | |
| CH 3647 | Santiago | 1972 | Heces | | | | |
| P 219/71 | Asunción | 1971 | Heces | | | | |
| P 227/71 | Asunción | 1971 | Sangre | | | | |

En 19 de estas determinaciones paralelas llevadas a cabo en suspensiones conservadas 24 horas a 5°C se comprobó una disminución promedial del 7% en el número de viables.

*Inoculación* — A partir de la suspensión madre, conservada 24 horas en heladera, se realizan diluciones apropiadas en S.T., de acuerdo con el resultado del recuento de viables. Se utilizó diez ratones para cada dosis, inoculando 0,2 ml de dilución por via intra-peritoneal. Para cada determinación se utilizó como mínimo cuatro diluciones seriadas comenzando por diluciones factor 5, para la determinación previa del nivel de virulencia, pero ajustando luego la DL 50, — en todos los casos — con diluciones de factor 2.

Los ratones de cada dosis se colocan en cajas separadas donde se mantienen 14 días.

*Determinación de la DL 50* — De acuerdo con la mortalidad observada en 14 días se calcula la DL 50 utilizando el método de Reed y Muench (28). — Con fines de comparación se utilizó el método de Miller y Tainter (22) en papel log. — probit sin apreciar diferencias que modifiquen los resultados.

*Determinación de la resistencia a drogas* — Para la determinación preliminar de la sensibilidad de las cepas empleadas se utilizó el método de difusión en placas de agar con discos impregnados con drogas procedentes de la casa Difco. — Para la determinación de los niveles de resistencia se empleó el método del tubo dilución en medio líquido aconsejado por el grupo cooperativo de estudio de la OMS (8).

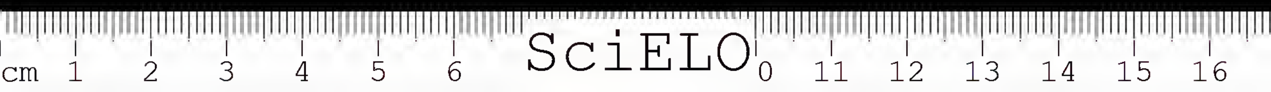
*Resultados* — En el Cuadro 2 se expresa, junto con el espectro de resistencia a drogas de las cepas epidémicas, el resultado de la determinación de la DL 50 para el ratón comparativamente con la de las cepas no epidémicas.

Los resultados obtenidos son muy llamativos pues 84,6% de las cepas, procedentes de brotes epidémicos ocurridos en 7 regiones de Latinoamérica, muestran DL 50 para el ratón superiores a $10^6$ y 9 de ellas por encima de $10^7$.

La excepción la constituyen las cepas aisladas en Paraguay y Chile, con DL 50 inferior a $10^6$; estas cepas tienen una característica común que las distingue de la mayoría de las otras, y es su sensibilidad al ácido nalidíxico.

La mayoría de las cepas estudiadas fueron aisladas de casos de enteritis, por cultivo de heces, pero 4 de ellas lo fueron de procesos extra-entéricos: M 1/72 y P 227/71 aisladas por hemocultivo; M 4/72 de pus de supuración mastoidea y BA 706 de líquido céfalo raquídeo. — Las cepas aisladas de sangre y L.C.R. tienen una DL 50 ligeramente inferior a la de las aisladas de heces de la misma región, pero — excluída P 227/71 — todas muestran una DL 50 para el ratón netamente superior a la encontrada en cepas no epidémicas, sensibles a drogas. — Esta diferencia





CUADRO 2

Resistencia a drogas y DL 50 de cepas epidémicas y no epidémicas de *S. typhimurium*.

| Cepas epidémicas (multi-resistentes) | | | Cepas no epidémicas (sensibles) | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Cepa N.º | Espectro resist. drogas | DL 50 | Cepa N.º | Espectro resist. drogas | DL 50 |
| M 30/71 | A C K S Su T Nx | $1,1 \times 10^7$ | M 22 | Su | $7 \times 10^3$ |
| M 1/72 | A S Su Nx | $1,6 \times 10^6$ | M 9 | " | $6,6 \times 10^4$ |
| M 4/72 | A C K S Su T Nx | $4,7 \times 10^7$ | M 10 | " | $1 \times 10^5$ |
| M 59/72 | C K S Su T Nx | $3 \times 10^6$ | M 94/72 | " | $1,2 \times 10^5$ |
| PV 1 | A C K S Su T Nx | $1,1 \times 10^7$ | M 96/73 | " | $5 \times 10^5$ |
| PV 4 | " " " | $1,5 \times 10^7$ | M 173/73 | " | $2,5 \times 10^5$ |
| PV 13 | " " " | $3,9 \times 10^6$ | M 177/73 | " | $3,3 \times 10^4$ |
| PV 26 | " " " | $3,2 \times 10^6$ | Bu 2 | " | $1,7 \times 10^5$ |
| BA 208 | C K S Su T Nx | $3,3 \times 10^6$ | CDC 9 | " | $3,6 \times 10^5$ |
| BA 706 | A C K S Su T Nx | $2,9 \times 10^6$ | d 1397 | " | $1,2 \times 10^5$ |
| R 1753 | " " " | $6,6 \times 10^6$ | d 1425 | " | $1,3 \times 10^5$ |
| R 1796 | " " " | $1,3 \times 10^7$ | d 2461 | " | $2,8 \times 10^5$ |
| LP 2491 | A C K S Su Nx | $1,7 \times 10^6$ | d 2798 | " | $3,3 \times 10^5$ |
| LP 3051 | A C K S Su T Nx | $5 \times 10^7$ | PE 367 | " | $7,7 \times 10^5$ |
| C 1 | C K S Su T Nx | $3 \times 10^7$ | PE 368 | S Su T | $7,5 \times 10^5$ |
| C 2 | A S Su Nx | $1,6 \times 10^6$ | PE 369 | Su | $4,2 \times 10^5$ |
| SP 1480 | A C K S Su T Nx | $3,9 \times 10^6$ | | | |
| SP 1545 | " " " | $8 \times 10^7$ | | | |
| SP 1550 | " " " | $1,4 \times 10^7$ | | | |
| SP 1564 | " " " | $4 \times 10^6$ | | | |
| Rec 3 | A C K S Su | $1,2 \times 10^7$ | | | |
| Rec 5 | " " " | $1 \times 10^7$ | | | |
| CH 3628 | A C K S Su T | $5 \times 10^5$ | | | |
| CH 3647 | " " " | $6 \times 10^5$ | | | |
| P 219/71 | " " " | $7,8 \times 10^5$ | | | |
| P 227/71 | " " " | $4,4 \times 10^5$ | | | |

Media aritmética de DL 50 — $8,92 \times 10^6$ — $2,84 \times 10^5$

Significancia de diferencia de medias: Para "n" = 40 "t" = 2,81
$P = < 0,01 > 0,005$

*Símbolos*

A — Ampicilina
C — Cloranfenicol
K — Kanamicina
S — Estreptomicina
Su — Sulfametoxazol
T — Tetraciclina
Nx — Ac. nalidíxico

es particularmente llamativa en la cepa M 4/72, aislada de un proceso supurado, con una DL 50 de $4{,}7 \times 10^{7}$.

Debe señalarse las grandes variaciones en la magnitud de la DL 50 de las cepas epidémicas, no sólo cuando se comparan las de cepas aisladas en diferentes regiones, como las de Chile y Paraguay, sino tambien entre las aisladas de un mismo brote. Debido a la limitación en el suministro de ratones no fué posible estudiar una muestra más amplia de cepas de cada región lo que hubiera permitido asegurarse de que los resultados obtenidos reflejan exactamente la realidad.

Las cepas estudiadas constituyen un material heterogéneo y no comparable estrictamente con la totalidad de las epidémicas cronológicamente, por su origen geográfico o fuente de aislamiento. — Sin embargo, si admitimos-con las reservas que esas diferencias implican — que pueden asimilarse a una muestra de las cepas normales en la naturaleza y la comparamos con la muestra constituida por las cepas epidémicas, surge entre ambas claras diferencias de virulencia. — La media aritmética de las DL 50 de ambos grupos de cepas es respectivamente de $2{,}8 \times 10^{5}$ y $8{,}9 \times 10^{6}$ es decir más de 30 veces superior en el caso de las cepas epidémicas.

Si tomamos en cuenta exclusivamente el material que puede considerarse más homogéneo para fines de comparación, es decir las cepas aisladas de lactantes en Montevideo antes y después de la producción de brotes epidémicos, siendo las primeras sensibles a los antibióticos y las segundas multirresistentes, encontramos que las diferencias son de magnitud aún mayor. — La media aritmética de la DL 50 de las primeras es de $2{,}1 \times 10^{5}$ y la de las segundas de $1{,}2 \times 10^{7}$, es decir que ésta es aproximadamente 57 veces mayor.

El análisis estadístico de los resultados se ve dificultado por los factores ya mencionados: la falta de cepas sensibles de igual región y orígen y la gran dispersión en los resultados lo que significa una alta desviación estandar. — Sin embargo, si determinamos la significancia

C U A D R O 3

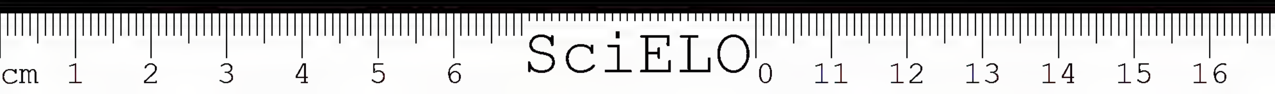
DISTRIBUCION DE 26 CEPAS EPIDEMICAS Y 16 NO EPIDEMICAS DE *SALMONELLA TYPHIMURIUM* EN FUNCION DE LA $DL_{50}$ PARA EL RATON

| CEPAS | TOTAL | $< 10^{5}$ | $> 10^{5}$ $< 10^{6}$ | $> 10^{6}$ $< 10^{7}$ | $> 10^{7}$ |
|---|---|---|---|---|---|
| EPIDEMICAS | 26 | 0 | 4 | 13 | 9 |
| NO EPIDEMICAS | 16 | 4 | 12 | 0 | 0 |

Para n = 3 $X^2 = 29{,}31$ $P = < 0{,}001$

de la diferencia de las medias aritméticas de ambos grupos, siendo "n" = 40, obtenemos un valor de "t" de 2,81 y $P < 0{,}01$ y $> 0{,}005$, es decir que la diferencia es significativa.





De igual manera si distribuímos ambas muestras en grupos de DL 50 creciente, como se muestra en el Cuadro 3, y determinamos $X^2$, encontramos un resultado que es altamente significativo ($X^2 = 29{,}31$; $P < 0{,}001$).

## DISCUSION

Es un axioma microbiológico que la virulencia es un carácter relativo, relacionado siempre con la especie animal en que se estudie. Sin embargo es habitual el empleo del ratón en experimentación salmonelósica, existiendo en los ultimos diez años una amplísima literatura donde se aborda diferentes aspectos de la interrelación salmonela-hospedero, y en particular los métodos de protección contra la infección salmonelósica; en muchas de esas investigaciones — explícita o implícitamente-se extrapola al hombre los resultados obtenidos en el ratón.

Creemos que nuestros hallazgos hacen dudar de la validez de las conclusiones a que se llega con ese modelo experimental.

Por razones obvias no es posible determinar directamente cual es la virulencia para el lactante de las cepas aisladas de brotes epidémicos, pero todos los marcadores indirectos como la fácil trasmisibilidad, alta letalidad y presencia de generalización indican que debe ser elevada. En contraste, la virulencia experimentalmente determinada en el ratón es estremadamente baja, especialmente en nueve de las cepas en las cuales la DL 50 es superior a $10^7$, lo que significa que estas tienen promedialmente una virulencia 55 veces inferior a la de cepas mantenidas en colección por mas de 40 años.

Discrepancias de tan alto nivel en la sensibilidad de ambos hospederos para determinadas cepas de salmonelas, indica que estas deben de poseer caracteres fisiológicos, antigénicos u otros que condicionen esa diferente virulência y que aún desconocemos. Es pues imprescindible aclarar esta interrogante antes que podamos progresar en nuestros conocimientos sobre la infección salmonelósica del lactante y en particular sobre los métodos de prevención.

Es indudable la influencia de los antígenos somáticos principales sobre la virulência experimental (19) siendo ademas necesaria la presencia de un polisacárido completo con largas cadenas laterales para asegurarla (25,27); los factores "O" accesorios 1,5 y $12_2$ — no parecen sin embargo influir sobre la virulencia de *S. typhimuriun* como lo ha demostrado Valtonen y Mäkelä (31) en variantes obtenidas por conversión lisogénica, mutación o recombinación genética.

Muy escasa es sin embargo nuestra información en cuanto al factor o factores que condicionan marcadas diferencias de virulencia entre cepas "S" que poseen idéntica composición antigénica. Jenkin (17, 18) ha postulado que puede ser debida a la similitud antigénica de componentes de la célula bacteriana virulenta y de la especie animal en que

se ensaya; siendo este antígeno propio de la especie animal, no genera anticuerpos específicos u opsoninas dirigidos contra el parásito. Hobson (12), estudiando comparativamente una cepa virulenta de *S. typhimurium* y una mutante de un solo paso resistente a estreptomicina y de virulencia disminuida, concluye que la diferencia esencial en ese caso reside en la velocidad de multiplicación y en la capacidad para alcanzar una población final crítica capaz de causar la muerte.

Las cepas que hemos estudiado son perfectamente "S" por todos los métodos ensayados e idénticas en composición antigénica, excepto en lo que se refiere al factor somático 5 que se encuentra con mayor frecuencia y mejor desarrollado en las cepas no epidémicas que en las epidémicas. Investigaciones iniciadas y que serán objeto de una publicación posterior, tienden a dilucidar el papel de este y otros factores antigénicos en la virulencia de ambas muestras.

Otro aspecto a aclarar, planteado pór nuestros resultados, es el mecanismo del cambio de virulencia comprobado. Podría sostenerse que ha intervenido el mecanismo biológico reconocido de exaltación de la virulencia por pasaje seriado en una especie, con pérdida de virulencia para otra. Si bien esta hipótesis no puede excluirse en forma absoluta hay argumentos para descartarla. En primer término la información epidemiológica es clara en cuanto a que las cepas epidémicas aparecieron bruscamente y que también abruptamente se modificaron los parámetros clínicos y epidemiológicos de la infección en el niño; no fué pues un proceso gradual, como debía de esperarse si el aumento de virulencia fuera debido al pasaje repetido en el hombre.

Por otra parte, en los cuarenta años en que hemos estudiado las salmonelosis del niño existieron oportunidades — y repetidamente se produjo — la trasmisión interhumana de la infección sin que nunca se observara modificación de la virulencia apreciable clínica o epidemiológicamente. Igualmente lo confirma el hecho de que las cepas provenientes de diferentes especies animales y las del niño — previamente a la eclosión de los brotes epidémicos — muestran similar virulencia para el ratón, independientemente del orígen.

El carácter objetivo que distingue a ambos grupos de cepas es su sensibilidad a los antibióticos, lo que sugiere su vinculación con las modificaciones de virulencia.

La resistencia por sí sola no parece poder explicar la aparición de brotes epidémicos. Si bien es cierto que en el ambiente hospitalario, donde las drogas antibacterianas son usadas con profusión, las cepas resistentes tienen mas posibilidades de subsistir y para trasmitirse por lo tanto de un enfermo a otro ésto no explica ni lo explosivo de su aparición ni las características del cuadro clínico. Varias décadas de uso de antibióticos en hospitales y la aparición de cepas resistentes a las sulfas primero y luego a estreptomicina, tetraciclinas, etc. no tuvieron consecuencias como las actuales.





Podría tal vez atribuirse a otro de los caracteres de las cepas actuales o sea a que poseen multirresistencia infecciosa trásmisible por herencia extracromosómica.

Anderson (2) ha señalado la posibilidad de que los plasmidios involucrados en la trasmisión de resistencia, podrían trasmitir igualmente determinantes capaces de modificar otras propiedades de las bacterias, incluyendo su virulencia. Por otra parte se ha demostrado que son variados los caracteres bacterianos trasmitidos por este mecanismo como capacidad para producir hemolisina (29), producción de enterotoxina (30), colicinas (4), penicilinasa (5), ataque de hidratos de carbono 7), etc. aisladamente o asociados con la trasmisión de determinantes de resistencia a drogas (21).

Con esta hipótesis de trabajo hemos realizado experiencias de conjugación de salmonelas epidémicas con sensibles y los resultados preliminares parecen confirmarla ya que se ha obtenido clones de la cepa sensible, que han recibido parte de los determinantes de resistencia y muestran una DL 50 promedial 25 veces superior a la de la cepa original.

La virulencia bacteriana depende de un delicado ajuste entre las características biológicas del agente y las del hospedero; cualquier modificación de ese equilibrio, derivada de la pérdida o adquisición de caracteres citológicos o fisiológicos, puede modificarla profundamente para algunas especies animales y no para otras.

Es pues ilusorio adelantar hipótesis sobre cual es la naturaleza del cambio que sufre la célula bacteriana cuando recibe el factor "R" y que es responsable de las modificaciones de virulencia encontradas. Sólo la investigación sistemática, planeada con ese objetivo, puede dar respuesta a las interrogantes planteadas.

Consideramos que es imprescindible la ampliación de nuestros conocimientos en este campo para desarrollar, con fundamentos sólidos, la profilaxia específica de la salmonelosis. Puede igualmente dar respuesta a otros interrogantes vinculados con la patogenia de la infección así como explicar las diferencias de comportamiento epidemiológico de diferentes tipos de salmonela con idéntica constitución antigénica.

*SUMMARY* — The virulence of a sample of 26 strains of multirresistant *S. typhimurium* isolated from epidemic outhreaks in nine cities of five south american countries (Argentina, Brazil, Chile Paraguay and Uruguay), has been studied in mice together with 16 non epidemic, sensitive, strains.

The arithmetic mean of the $LD_{50}$ of epidemic strains is $8{,}92 \times 10^6$ comparing with $2{,}84 \times 10^5$ for the sensitives ones ($P = < 0{,}01, > 0{,}005$). These unexpected results are stressed because of its bearing on studies employing mice as an experimental model, mainly those concerning pathogenesis of salmonella infections and their specific prevention.

Factors responsible for the low virulence for mice of strains highly virulent for man, so as the underlying mechanism of the change are discussed, pointing the need for systematic research on this field.

PELUFFO, C. A., IRINO, K. & MELLO, S. — Virulencia y multirresistencia a drogas de cepas epidemicas de *S. typhimurium* aisladas en hospitales infantiles de Sudamerica. I — Virulencia comparativa para el raton de cepas epidemicas.

*Mem. Inst. Butantan, 38*: 1-12, 1974.

*UNITERMS* — Comparative virulence for mice. *S. typhimurium:* Epidemic, multirresistant strains. Non epidemic, sensitive strains.

AGRADECIMIENTOS: Agradecemos a los Drs. Teresa Eiguer, Gil Pessoa, Ingenborg Prenzel, Amilcar Canesse y Hernan Miranda por el suministro de las cepas utilizadas en este trabajo. Al Dr. Murillo Paca Azevedo, Director del Instituto Pasteur de San Pablo, por havernos facilitado los ratones de su criadero.

## BIBLIOGRAFIA

1. ALVAREZ, F. et al.
Consideraciones clinico-bacteriológicas sobre diarreas agudas de lactantes hospitalizados. *Arch. Ped. Uruguay*, (en Prensa).

2. ANDERSON, D. S.
Drug resistance of *S. typhimurium* and its implications. *Br. Med. J. 3*:333-39, 1968.

3. BUZZO, N. et al.
Estudio epidemiológico de infecciones por salmonelas en el Hospital de Niños de Buenos Aires. En: V Congreso L. A. de Microb., Resúmenes de Trabajos, pp. 51. P. del Este, 1971.

4. CLOWES, R. C.
Transfert génétique des facteurs colicinogènes. *Ann. Inst. Pasteur 107* (n.º 5, suppl.): 74-92, 1964.

5. DATTA, N. & P. KONTOMICHALOU.
Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae. Nature 208*:239-241, 1965.

6. D'EMPAIRE, MATILDE & EIGUER, T.
Aislamiento de *S. typhimurium* en coprocultivo. Su relación con otros enteropatógenos. En: V Congreso L. A. de Microb., Resúmenes de Trabajos, pp. 47-48. P. del Este, 1971.

7. ECHOLS, H.
Properties of F' strains of Escherichia coli superinfected with F-lactose and F-galactose episomes. *J. Bacteriol. 85*:262-268, 1963.

8. ERICSSON, H. M. & SHERRIS, J. C.
Antibiotic sensivity testing. Report, of an international collaborative study. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, Sect. B, suppl. n.º 217, 90 pp. 1971.

9. FALCÃO, DEISE PASSETTO
Estudo bacteriológico de infecções entéricas em crianças até 2 anos, no município de Araraquara, SP. *Rev. Microb. (Brasil), 3*:127-138, 1972.

10. GALIANA, J. et al.
Epidemiologia de salmonelosis en racién nacidos y lactantes en el Hospital P. Rossell. *Arch Ped. Uruguay, 43*:3-14, 1972.

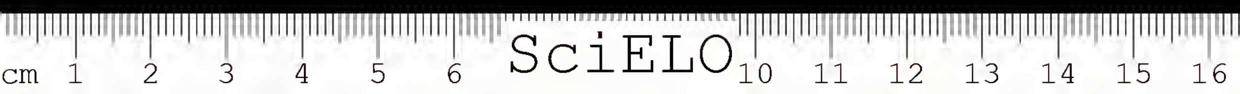
11. GONZALE CORTEZ, A. et al.
Typhoid fever. —Mexico 1972 and 1973. *Morbid. and Mortal. Wkly. Rep. 22*:350-55, 1973.

12. HOBSON, D.
The behaviour of a Mutant strain of *Salmonella typhimurium* in Experimental Mouse Typhoid. *J. Hygiene. 55*:322-33, 1957.

13. HORMAECHE, E. & PELUFFO, C. A.
Salmonellosis in infancy and its diagnosis. *Puerto Rico J. Pub. Health & Trop. Med. 17*:99-123, 1941.

14. HORMAECHE, E.; PELUFFO, C. A. y ALEPPO, P. L.
S. cerro, nuevo tipo de salmonela. Estudio bacteriológico y clinico. *Arch Ped. Uruguay, 13*:368-375, 1942.





PELUFFO, C. A., IRINO, K. & MELLO, S. — Virulencia y multirresistencia a drogas de cepas epidemicas de *S. typhimurium* aisladas en hospitales infantiles de Sudamerica. I — Virulencia comparativa para el raton de cepas epidemicas.

*Mem. Inst. Butantan, 38*: 1-12, 1974.

15. HORMAECHE, E.; SURRACO, N. L.; PELUFFO, C. A. y Aleppo, P.L.
Causes of infantile human diarrhea. *Am. J. Dis. Children, 66*:539-551, 1943.

16. HORMAECHE, C. E.; DEMARCO, R.; ALIA, C.; SCHELOTTO, F. & RIVAS, C.
Salmonelosis intrahospitalaria en el Hospital P. Visca. *Arch. Ped. Uruguay 43*:15-24, 1972.

17. JENKIN, C. R.
An antigenic basis for virulence of strains of *S. typhimurium. J. Exp. Med. 115*:731, 1962.

18. JENKIN, C. R. & ROWLEY, D.
Partial purification of the "protective" antigen of *Salmonella typhimurium* and its distribution amongst various strains of bacteria. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 43*:65-78, 1965.

19. MÄKELÄ, HELENA; V. V. VALTONEN, and M. VALTONEN.
Role of O-antigen (Lipopolysaccharide) Factors in the Virulence of *Salmonella. J. Inf. Dis. 128*:581-85, 1973.

20. MATA, L. J. et al.
Epidemic Shiga Bacillus dysentery in Central America. I. Etiologic investigations in Guatemala, 1969. *J. Infect. Dis. 122*:170-180, 1970.

21. MEYNELL, E.; MEYNELL, G. G. & DATTA, N.
Phylogenetic relationships of drug-resistance factors and other transmissible bacterial plasmids. *Bact. Rev. 32*:55-83, 1968.

22. MILLER, L. C. & TAINTER, M. L.
Estimation of the $ED_{50}$ and its error by means of logarithmic probigraph paper. *Pro. Soc. Exp. Biol. Med. 57*:261-64, 1944.

23. MILES, A.; MISRA, S. S. & IRWING, J. O.
The estimation of the bactericidal power of the blood. *J. Hyg.* (Camb.) *38*:732, 1938.

24. MOLTENI, O.; NOTARIO, R. & BORDA, N.
Incidencia de *S. typhimurium* en niños con sindrome diarreico en la Ciudad de Rosario. En: V. Congresso L. A. de Microb., Resúmenes de Trabajos, pp. 49-50., P. del Este, 1971.

25. NAKANO, M. & SAITO, K.
Chemical components in the cell wall of *Salmonella typhimurium* affecting its virulence and immunogenicity in mice. *Nature. London, 222*:1085-6, 1969.

26. PRENZEL, INGEBORG. Comunication personal.

27. ROANTREE, R. J.
Salmonella O antigens and virulence. *Ann. Rev. Microb. 21*:433-466, 1967.

28. REED, L. J. & MUENCH, H.
A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg. 27*:493-497, 1938.

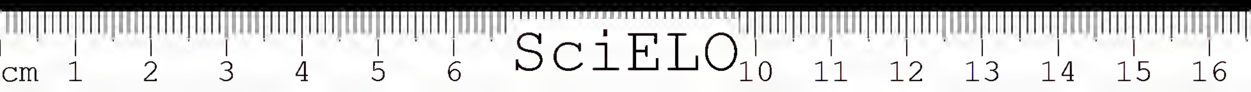
29. SMITH, H. W. & S. HALLS.
The transmissible nature of the genetic factor in *Escherichia coli* that controls haemolysin production. *J. Gen. Microbiol. 47*:153-161, 1967.

30. SMITH, T. W. & S. HALLS.
The transmissible nature of the genetic factor in *Escherichia coli* that controls enterotoxin production. *J. Gen. Microbiol. 52*:319-334, 1968.

31. VALTONEN, V. V. & MÄKELÄ, P. H.
The effect of lipopolysaccharides modifications — antigenic factors $1,5,12_2$, and 27 — on the virulence of salmonella strains for mice. *J. Gen. Microb. 69*:107-115, 1971.

Recebido para publicação em 30-IV-1974 e aceito em 9-X-1974.





Mem. Inst. Butantan
38: 13-30, 1974

# CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO IMUNOQUÍMICO DE VENENOS BOTRÓPICOS

## I. *Análise comparativa dos componentes antigênicos de seis espécies de venenos frente a seus respectivos antivenenos, através das técnicas de dupla difusão e imunoeletroforese en gel de ágar.*

MEDARDO SILES VILLARROEL*
FLÁVIO ZELANTE**
REYNALDO SCHWINDT FURLANETTO***
RAYMUNDO ROLIM ROSA***

*RESUMO* — Os autores analisaram comparativamente os componentes antigênicos de seis espécies de venenos botrópicos frente a seus respectivos antivenenos, "in natura" e "purificados" através de micrométodos de Ouchterlony e de Grabar & Williams.

Concluem, que a metodologia aplicada, permitiu a obtenção de resultados satisfatórios quando da separação dos componentes antigênicos, principalmente pela imunoeletroforese. Os antivenenos purificados permitem caracterizar melhor os componentes antigênicos quando seus resultados são comparados com os obtidos com antivenenos "in natura".

*UNITERMOS* — Venenos botrópicos; dupla difusão em gel de ágar de venenos botrópicos; imunoeletroforese de venenos botrópicos.

## INTRODUÇÃO

Em trabalhos anteriores, utilizando-se de membranas de "Cellogel" verificamos electroforeticamente, o número de frações que compõem os venenos de algumas espécies de serpentes do gênero *Bothrops*, sendo que para a espécie *B. jararaca*, pudemos distinguir 15 frações (Siles Villarroel, 1972; Siles Villarroel e col., 1973).

Uma análise dos trabalhos publicados a esse respeito evidencia que poucos autores se preocuparam com o estudo da composição antigênica dos venenos ofídicos e, em particular com a dos venenos do gênero *Bothrops;* aqueles que estudaram o assunto sob este aspecto limitaram-se a verificar a existência de componentes comuns aos vários venenos, através da reação de neutralização "in vivo" ou, então, muito mais raramente, "in vitro". Neste aspecto, podemos destacar o trabalho de Rosenfeld e col. (1962).

Ex-assistente da Seção de Imunologia do Instituto Butantan e Professor Assistente Doutor do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da U.S.P.
** Professor Assistente Doutor do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da U.S.P.
*** Atual Diretor do Instituto de Ciências Biomédicas da U.S.P. e Professor Catedrático do Departamento de Microbiologia do mesmo Instituto.
**** Diretor do Serviço de Imunologia do Instituto Butantan e Professor Assistente Doutor do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da U.S.P.

Endereço para correspondência:
C.P. 4365 — S. Paulo — Brasil.





Não encontramos na literatura consultada trabalhos que estabeleçam uma análise comparativa entre os resultados observados com os venenos botrópicos, quando da aplicação das técnicas de dupla difusão e de imunoeletroforese em gel de ágar. Os autores se limitaram em analisar isoladamente, utilizando de uma das duas técnicas. Quer nos parecer que, entre nós, somente Gonçalves (1961) realizou este estudo comparativo, porém com veneno crotálico.

Schenberg (1958, 1961 e 1963), aplicando a técnica de Ouchterlony, realizou observações com os venenos das espécies *B. jararaca* e *B. neuwiedi*, introduzindo algumas modificações na metodologia original.

Este autor conclui da possibilidade de existir um grande número de componentes antigênicos nesses venenos, tendo ainda verificado que, em seis sub-espécies de *B. neuwiedi*, os venenos também diferem, entre si, imunologicamente.

Outros autores, utilizando venenos de serpentes de vários gêneros, inclusive o botrópico, e aplicando a técnica de dupla difusão em gel de ágar, apresentaram resultados que assim podem ser sintetizados:

1 — é possível a utilização desse método no estudo da composição antigênica dos venenos ofídicos (Grasset e col. 1956a e 1956b);

2 — é possível determinar a existência de identidades antigênicas entre venenos de serpentes do mesmo gênero (Scavini & Ferraresi, 1962) e mesmo em gênero bastante distantes (Boquet e col., 1969).

A imunoeletroforese também foi aplicada por alguns autores para verificar a composição antigênica de venenos ofídicos, inclusive de espécies do gênero *Bothrops*.

Parece-nos que foi Gonçalves (1961), quem primeiramente se utilizou desta metodologia no estudo dos venenos ofídicos, aplicando-a na verificação da composição do veneno crotálico.

Rascovsky & Scavini (1964), utilizaram da mesma técnica para verificar a presença de anticorpos contra os venenos *B. alternatus*, *B. neuwiedi* e *C. terrificus*, nas frações globulínicas $\beta_1$ e $\beta_2$ de antivenenos específicos.

Ferri (1967), entre nós, verificou através da imunoeletroforese, o comportamento do veneno *B. atrox* tendo, todavia realizado a separação eletroforética prévia do antiveneno, para em seguida realizar a difusão do veneno. Tal modelo experimental, demonstrou as linhas de precipitação, somente na região $\gamma$ globulínica, o que aliás, era o único objetivo do autor.

Uriel e col. (1968), pela aplicação da imunoeletroforese caracterizaram a natureza antigênica de duas enzimas constitutivas do veneno

da espécie *B. jararaca*, previamente isoladas através de processos químicos, demonstrando que uma delas é bastante heterogênica e, a outra, representada por uma única fração.

Jouannet (1968), realizando a imunoeletroforense de vários venenos de serpentes provenientes da Etiópia, obteve uma nítida e satisfatória separação dos componentes antigênicos dessas peçonhas.

Boquet e col. (1969), aplicando esta metodologia, verificaram que, a α toxina do veneno *N. nigricollis*, é comum a outros venenos de espécies de serpentes diferentes.

Face ao exposto, nos propusemos a estudar comparativamente, contando com o aprimoramento das técnicas imunoquímicas originais de Ouchterlony e de Grabar & Williams, a composição antigênica de seis espécies de venenos de serpentes do gênero *Bothrops*. Os resultados obtidos, eventualmente poderão fornecer subsídios a serem utilizados em outros campos, como da filogenia e da sistemática das serpentes botrópicas.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Venenos ofídicos*

Os venenos ofídicos utilizados, fornecidos pelo Instituto Butantan, foram obtidos por extração manual de numerosas serpentes adultas, cristalizados a vácuo e mantidos na geladeira a 0-4°C. Utilizamo-nos das peçonhas das seguintes espécies: *Bothrops jararaca* (Wied, 1824), *Bothrops alternatus* Duméril, Bibron et Duméril, 1854, *Bothrops insulares* (Amaral, 1921), *Bothrops jararacussu* Lacerda 1844, *Bothrops moojeni* Hoge, 1965* e *Bothrops cotiara* (Gomes, 1913).

Foram preparadas soluções a 0,5%, 1%, 2% e 4% a partir do veneno cristalizado, em solução fisiológica (NaCl a 0,85%) distribuidas em frascos contendo 2 ml de cada solução, hermeticamente fechados e mantidos à temperatura de -25°C, (Furlanetto, 1965). No momento do uso, as soluções eram descongeladas e os excedentes desprezados.

### *Soros Hiperimunes*

Utilizamo-nos de antivenenos específicos, obtidos por hiperimunização de seis cavalos (um para cada espécie de veneno); os animais escolhidos apresentavam-se em condições normais de saúde e nunca haviam sido antes utilizados para outras imunizações. As hiperimunizações obedeceram ao esquema adotado pelo Serviço de Imunização do Instituto Butantan.

---

*A Bothrops moojeni* Hoge, 1965, era até então, classi icada como *Bothrops atrox*.





SILES VILLARROEL, M., ZELANTE, F., FURLANETTO, R. S. & ROLIM ROSA, R. — Contribuição ao estudo imunoquímico de venenos botrópicos. I — Análise comparativa dos componentes antigênicos de seis espécies de venenos frente a seus respectivos antivenenos, através das técnicas de dupla difusão e imunoeletroforese em gel de ágar.
*Mem. Inst. Butantan, 38*: 13-30, 1974.

Ao término das hiperimunizações, cerca de sete dias após a última inoculação, foram realizadas as sangrias finais em duas etapas:

a) inicialmente retiravam-se 500 ml de sangue; este era deixado coagular e o soro era decantado e centrifugado a 3.000 rpm por 20 minutos. Em seguida, era o soro distribuido em volumes de 10 ml e guardado em frascos hermeticamente fechados e conservados a -25°C até sua utilização. Este material constitui o que chamamos de antiveneno "in natura".

b) o restante de cada sangria individual era feita em recipiente contendo citrato de sódio a 1,7 g por 100 ml de sangue; o plasma era decantado após 24 horas de sedimentação dos elementos figurados e encaminhado à purificação e concentração pelo método de Pope (1938-1939) modificado por Furlanetto (1961), técnica usualmente adotada nos laboratórios do Instituto Butantan. O material assim tratado constitui o que chamamos de "antiveneno purificado".

*Titulação dos antivenenos*

A titulação dos antivenenos foi realizada pelo método de Vital Brazil, segundo a Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil (1959). A atividade neutralizante dos antivenenos está expressa na tabela I.

TABELA I

TÍTULOS APRESENTADOS PELO DOSEAMENTO "IN VIVO", SEGUNDO O MÉTODO DE VITAL BRAZIL, DOS ANTIVENENOS OBTIDOS

| Veneno | Título do antiveneno "in natura" (mg/ml) | Título do antiveneno purificado (mg/ml) |
|---|---|---|
| *B. jararaca* | 2,0 | 5,0 |
| *B. alternatus* | 3,0 | 6,0 |
| *B. insularis* | 4,0 | 15,0 |
| *B. jararacussu* | 2,0 | 5,5 |
| *B. moojeni* | 2,0 | 4,0 |
| *B. cotiara* | >2,0<3,0 | 9,0 |

*Dupla difusão em gel de ágar*

Para a realização desta prova, baseamo-nos nos trabalhos originais de Ouchterlony (1948, 1949). A perfuração do ágar obedeceu aos modelos adotados por Ferri (1968) e sumariamente consta dos seguinte procedimentos:

*Preparo prévio da lâmina*

Foram utilizadas lâminas de microscopia de 7,5 x 2,5 cm e de 1 mm de espessura, numeradas em uma de suas extremidades.

As lâminas, sulfocromicamente limpas, eram revestidas com 1,0 ml de ágar (Bacto Ágar Difco) a 1% em água destilada. Em seguida, eram levadas à estufa a 37°C até a completa secagem do ágar. Assim preparada, as lâminas conservavam-se até o momento de sua utilização.

No momento do uso, as lâminas recebiam um segundo revestimento, constituído por 3,0 ml de ágar (Bacto Ágar Difco), a 1% em solução fisiológica, adicionado de mertiolato a 1:10.000. Deixava-se solidificar por 10 minutos à temperatura do laboratório.

Após o tratamento acima descrito, com o auxílio de perfuradora de diâmetro de 5 mm, eram abertos os orifícios. Padronizamos a utilização de três perfurações, com uma disposição triangular, com 8 mm de distância entre cada orifício. A retirada dos fragmentos de ágar era realizada com o auxílio de uma agulha de grosso calibre, adaptada a uma trompa de vácuo.

*Execução da dupla difusão em gel de ágar*

Em todas as reações, padronizamos, a colocação do antiveneno na perfuração do vértice superior ou inferior e a colocação das soluções de venenos, nas outras duas perfurações conforme o modelo experimental adotado.

Também padronizamos, para todas as reações realizadas, o volume de 0,02 ml, quer das soluções de venenos, quer de antivenenos. As lâminas eram colocadas imediatamente em câmaras umedecidas com uma solução de sulfato de cobre a 1%, onde permaneciam por 48 horas. Em seguida, as lâminas eram lavadas por três dias, imersas em cubas com solução fisiológica (NaCl a 0,85%) que era renovada duas vezes ao dia. Após este período, eram envolvidas em papel filtro umedecido em água destilada e colocadas na estufa a 60°C, até completar a secagem do papel. Esta operação era repetida mais uma vez. Em seguida, eram lavadas em água corrente e novamente submetidas a 60°C na estufa até a secagem do ágar. Após o resfriamento, eram coradas pelo Amido Schwarz 10 B a 4% em ácido acético, durante 10 minutos. Seguia-se a descoloração pelo ácido acético a 5% e subseqüente lavagem em água corrente e secagem à temperatura ambiente. Para melhor visualização das linhas de precipitação, realizamos a leitura das lâminas com o auxílio de Imunocópio de Projeção Zeiss *.

* Montado nos Laboratórios de Carl Zeiss — Companhia Ótica e Mecânica, segundo recomendações técnicas do Prof. R. G. Ferri.





SILES VILLARROEL, M., ZELANTE, F., FURLANETTO, R. S. & ROLIM ROSA, R. — Contribuição ao estudo imunoquímico de venenos botrópicos. I — Análise comparativa dos componentes antigênicos de seis espécies de venenos frente a seus respectivos antivenenos, através das técnicas de dupla difusão e imunoeletroforese em gel de ágar.

*Mem. Inst. Butantan, 38*: 13-30, 1974.

*Imunoeletroforese*

Seguimos as técnicas de Grabar & Williams (1953 e 1955), com as modificações propostas por Ferri & Cossermelli (1964), relativas à aparelhagem e técnicas necessárias à realização do micrométodo por nós utilizado e que sumariamente consiste no seguinte:

*Aparelhagem para Imunoeletroforese*

a) retificador de corrente, munido de miliamperímetro e voltímetro, regulável de zero a 100 mA e de zero a 500 volts;
b) cuba de "plexiglás", de procedência nacional, confeccionada segundo o modelo preconizado por Ferri e Cossermelli (1964);
c) lâminas de microscopia de 7,5 x 2,5 cm e de 1 mm de espessura, numeradas em uma de suas extremidades.

*Preparo de lâminas*

As lâminas quimicamente limpas pelo tratamento sulfocrômico eram revestidas com 1,0 ml de ágar (Bacto Ágar Difco) a 1% em água destilada. Em seguida, eram levadas à estufa a 37°C, até a completa secagem do ágar. Assim preparadas, conservam-se até o momento de sua utilização.

No momento do uso as lâminas recebiam um segundo revestimento com 3,0 ml de ágar a 1% (Bacto Ágar Difco), em solução tampão de veronal acetato com pH 8,6 e força iônica de 0,05, adicionado de mertiolato a 1:10.000. Deixava-se solidificar por 10 minutos e em seguida, o ágar era recortado. A abertura das fendas e do orifício central, era realizada através de um aparelho recortador, equipado com lâminas laterais e tubo central oco. As fendas apresentavam um comprimento de 6,5 cm por 1 mm de largura; o orifício central tinha um diâmetro de 2 mm. As distâncias entre o orifício e as fendas eram de 5 mm. A retirada dos fragmentos de ágar era realizada com o auxílio de uma agulha de grosso calibre, adaptada a uma trompa de vácuo.

*Execução da imunoeletroforese*

A solução de veneno era depositada no orifício central, com o auxílio de tubo capilar de vidro, observando-se os cuidados necessários para que não transbordasse. Era depositado um volume de, aproximadamente, 0,015 ml de solução. Em seguida, a lâmina era colocada na cuba que continha uma solução tampão de veronal acetato com pH 8,6 e força iônica 0,1, com a sua numeração voltada para o polo negativo; era então, acionada a fonte elétrica, regulada em 15 mA por lâmina, pelo período de uma hora.

SILES VILLARROEL, M., ZELANTE, F., FURLANETTO, R. S. & ROLIM ROSA, R. — Contribuição ao estudo imunoquímico de venenos botrópicos. I — Análise comparativa dos componentes antigênicos de seis espécies de venenos frente a seus respectivos antivenenos, através das técnicas de dupla difusão e imunoeletroforese em gel de ágar.

*Mem. Inst. Butantan, 38*: 13-30, 1974.

Após a corrida eletroforética de veneno, as lâminas eram retiradas da cuba e tinham as suas fendas laterais preenchidas pelo antiveneno, com o auxílio de seringa hipodérmica de 1,0 ml de capacidade, equipada com agulha de pequeno calibre. Era depositado um volume de 0,1 ml. Em seguida, as lâminas eram colocadas em câmaras umedecidas com solução de sulfato de cobre a 1%, pelo período de 48 horas, e a seguir lavadas por três dias, imersas em cubas com solução fisiológica que era renovada duas vezes ao dia. Após este período, eram envolvidas em papel de filtro umedecido em água destilada e colocadas na estufa a 60°C, até completar a secagem do papel. Esta operação era repetida mais uma vez. Eram então lavadas em água corrente e novamente submetidas a 60°C na estufa, até a secagem do ágar. Após o resfriamento, eram coradas pelo Amido Schwarz 10 B a 4% em ácido acétido durante 10 minutos. Seguia-se a descoloração pelo ácido acético a 5% e subseqüente lavagem em água corrente e secagem à temperatura ambiente.

Também neste caso, a leitura das lâminas foi realizada com o auxílio do Imunoscópio de Projeção Zeiss, da mesma forma como procedido para as lâminas de dupla difusão em gel de ágar.

## RESULTADOS

*Análise comparativa entre o número de linhas de precipitação obtidas na dupla difusão em gel de ágar e o número de linhas obtidas na imunoeletroforese, entre os venenos e os respectivos antivenenos específicos "in natura".*

Como os antivenenos obtidos "in natura" apresentaram títulos de anticorpos diferentes (tabela I) decidimos nivelar a concentração de título de anticorpos para cada antiveneno específico. Assim sendo, diluímos, quando necessário o antiveneno para 2 mg/ml (1,0 ml de antiveneno neutralizando 2 mg de veneno). Com estes antivenenos realizamos vários ensaios preliminares, colocando-os frente à concentrações variáveis de veneno (0,5%, 1%, 2% e 4%), tanto para a dupla difusão em gel de ágar como para a imunoeletroforese. Quanto ao primeiro método pudemos verificar que a concentração a 0,5% dos venenos, não permitia exteriorizar com nitidez algumas das linhas de precipitação por falta da intensidade na coloração. As concentrações superiores a 1% não mostravam vantagem alguma quanto ao número de linhas obtidas e, pelo contrário, dificultavam a leitura visto que coravam muito intensamente tendo o corante se difundido entre uma linha e outra. A mencionada concentração de 1% dos venenos, além de evidenciar maior número de linhas de precipitação, facilitava a leitura, sendo por essa razão escolhida para a metodologia em questão. Quanto a imunoeletroforese, fenômenos semelhantes foram observados; a concentração de 0,5% não permitia





evidenciar com nitidez todas as linhas de precipitação, resultando na obtenção de um número menor de linhas que nas concentrações maiores.

As lâminas correspondentes às concentrações de veneno de 2% e 4%, após sua coloração, ficaram coradas em excesso e com difusão do corante entre as linhas, apesar da lavagem prolongada. Além disso, essas concentrações fizeram com que a migração do veneno, nas nossas condições de trabalho, fosse mais lenta, resultando em acúmulo de linhas em determinada zona da lâmina, o que dificultava em muito a leitura. Adotamos a concentração de 1%, pois, foi aquela que permitiu uma nítida separação das linhas e conseqüentemente uma visualização mais completa do seu número.

A tabela II decalcada das figuras 1 a 12 apresenta o número de linhas de precipitação obtidas com cada veneno e seu respectivo antiveneno "in natura" através das duas técnicas por nós utilizadas.

TABELA II

COMPARAÇÃO DO NÚMERO DE LINHAS DE PRECIPITAÇÃO OBTIDAS NAS REAÇÕES DE DUPLA DIFUSÃO E IMUNOELETROFORESE EM GEL DE ÁGAR (SOLUÇÕES DE VENENOS A 1% E ANTIVENENOS ESPECIFICOS "IN NATURA" NEUTRALIZANDO 2 MG/ML)

| Solução de Veneno | N.º de linhas obtidas na dupla difusão em gel de ágar | N.º de linhas obtidas na imunoeletroforese |
|---|---|---|
| *B. jararaca* | 9 | 16 |
| *B. alternatus* | 9 | 14 |
| *B. insularis* | 10 | 14 |
| *B. jararacussu* | 8 | 11 |
| *B. moojeni* | 8 | 12 |
| *B. cotiara* | 8 | 14 |

As figuras 1 a 12 ilustram os resultados consubstanciados pela tabela II.




Fig. 1 — LÂMINA N.º C-28. Dupla difusão em gel de ágar, entre a solução de veneno de *B. jararaca* a 1% e o antiveneno específico "in natura".

SILES VILLARROEL, M., ZELANTE, F., FURLANETTO, R. S. & ROLIM ROSA, R. — Contribuição ao estudo imunoquímico de venenos botrópicos. I — Análise comparativa dos componentes antigênicos de seis espécies de venenos frente a seus respectivos antivenenos, através das técnicas de dupla difusão e imunoeletroforese em gel de ágar.

*Mem. Inst. Butantan, 38*: 13-30, 1974.




Fig. 2 — LÂMINA N.º C-86. Dupla difusão em gel de ágar, entre a solução de veneno de *B. alternatus* a 1% e o antiveneno específico "in natura".

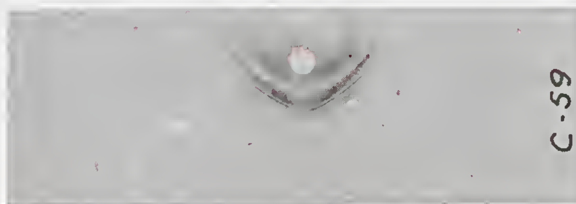



Fig. 3 — LÂMINA N.º C-59. Dupla difusão em gel de ágar, entre a solução de veneno de *B. insularis* a 1% e o antiveneno específico "in natura".




Fig. 4 — LÂMINA N.º C-92. Dupla difusão em gel de ágar, entre a solução de veneno *B. jararacussu* a 1% e o antiveneno específico "in natura".

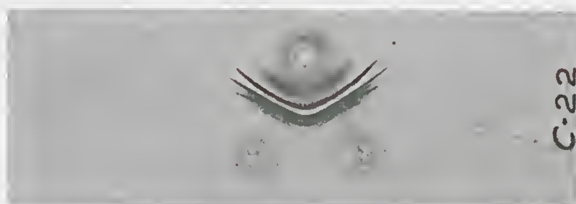



Fig. 5 — LÂMINA N.º C-22. Dupla difusão em gel de ágar, entre a solução de veneno de *B. moojeni* a 1% e o antiveneno específico "in natura".

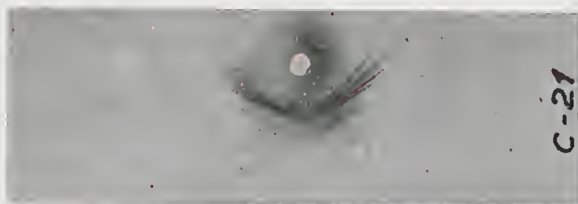



Fig. 6 — LÂMINA N.º C-21. Dupla difusão em gel de ágar, entre a solução de veneno de *B. cotiara* a 1% e o antiveneno específico "in natura".

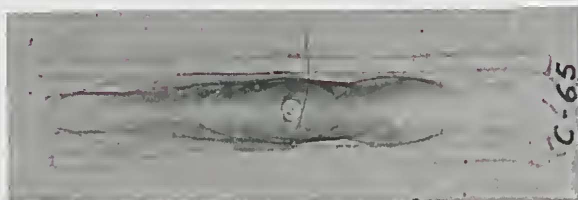



Fig. 7 — LÂMINA N.º C-65. Imunoeletroforese entre a solução de veneno de *B. jararaca* a 1% e o antiveneno específico "in natura".

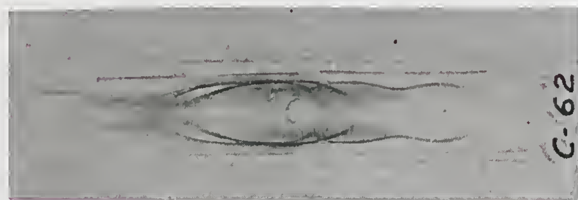



Fig. 8 — LÂMINA N.º C-62. Imunoeletroforese entre a solução de veneno de *B. alternatus* a 1% e o antiveneno específico "in natura".

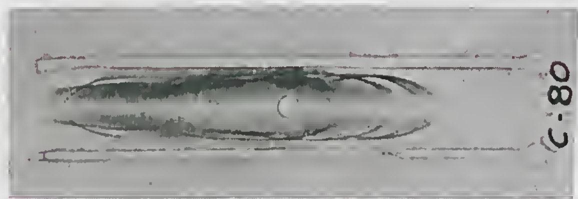



Fig. 9 — LÂMINA N.º C-80. Imunoeletroforese entre a solução de veneno de *B. insularis* a 1% e o antiveneno específico "in natura".

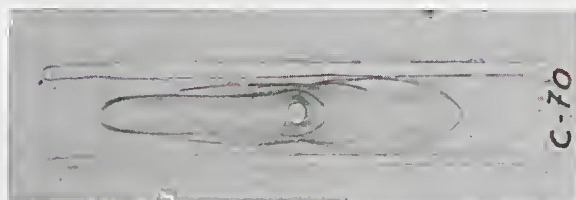



Fig. 10 — LÂMINA N.º C-70. Imunoeletroforese entre a solução de veneno de *B. jararacussu* a 1% e o antiveneno específico "in natura".

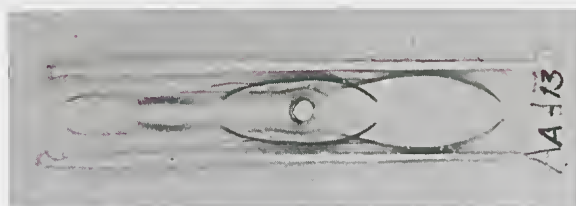



Fig. 11 — LÂMINA N.º A-13. Imunoeletroforese entre a solução de veneno de *B. moojeni* a 1% e o antiveneno específico "in natura".

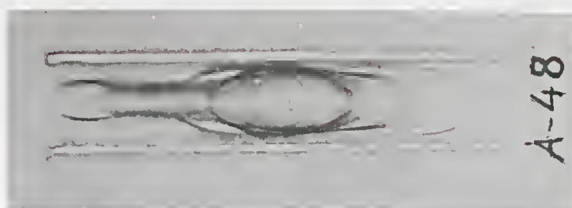



Fig. 12 — LÂMINA N.º A-48. Imunoeletroforese entre a solução de veneno de *B. cotiara* a 1% e o antiveneno especifco "in natura".

Do exposto parece não haver dúvidas de que, submetendo-se o veneno à corrida eletroforética e, em seguida, realizando a imunodifusão com o antiveneno "in natura", obtém-se sempre um número maior de linhas de precipitação, quando se comparam esses resultados com o número de linhas obtidas na reação de dupla difusão em gel de ágar.

SILES VILLARROEL, M., ZELANTE, F., FURLANETTO, R. S. & ROLIM ROSA, R. — Contribuição ao estudo imunoquímico de venenos botrópicos. I — Análise comparativa dos componentes antigênicos de seis espécies de venenos frente a seus respectivos antivenenos, através das técnicas de dupla difusão e imunoeletroforese em gel de ágar.

*Mem. Inst. Butantan, 38*: 13-30, 1974.

## ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE O NÚMERO DE LINHAS DE PRECIPITAÇÃO OBTIDAS NA DUPLA DIFUSÃO EM GEL DE ÁGAR E O NÚMERO DE LINHAS OBTIDAS NA IMUNOELETROFORESE, ENTRE OS VENENOS E OS RESPECTIVOS ANTIVENENOS ESPECÍFICOS PURIFICADOS.

Como os antivenenos purificados apresentaram, em geral, elevado título de anticorpos (tabela I), decidimos trabalhar reduzindo as concentrações a um mesmo título, limitado pelo menor obtido, isto é, 4 mg/ml (1,0 ml de antiveneno neutralizando 4 mg de veneno). Para essa concentração de anticorpos testamos várias concentrações do veneno, conforme o especificado na primeira parte deste capítulo. As experiências prévias vieram demonstrar que nestas condições de trabalho, era preferível usarmos concentração de veneno a 2%, tanto para a reação de dupla difusão em gel de ágar, como para a reação de imunoeletroforese.

A tabela III decalcada das figuras 13 a 24, apresenta o número de linhas de precipitação obtidas em cada veneno e seu respectivo antiveneno, através das duas técnicas por nós utilizadas.

TABELA III

*Comparação do nmero de linhas de precipitação obtidas nas reações de dupla difusão e imunoeletroforese em gel de ágar (solução de veneno a 2% e antivenenos específicos purificados, neutralizando cada um 4 mg/ml).*

| *Solução de veneno* | *N.º de linhas obtidas na dupla difusão em gel de ágar* | *N.º de linhas obtidas na imunoeletroforese* |
|---|---|---|
| *B. jararaca* | 10 | 16 |
| *B. alternatus* | 9 | 17 |
| *B. insularis* | 10 | 16 |
| *B. jararacussu* | 11 | 12 |
| *B. moojeni* | 9 | 13 |
| *B. cotiara* | 9 | 15 |

As figuras 13 a 24 ilustram os resultados consubstanciados pela tabela III.

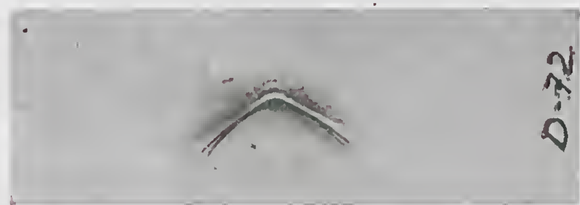



Fig. 13 — LÂMINA N.º D-72. Dupla difusão em gel de ágar, entre a solução de veneno de *B. jararaca* a 2% e o antiveneno específico purificado.

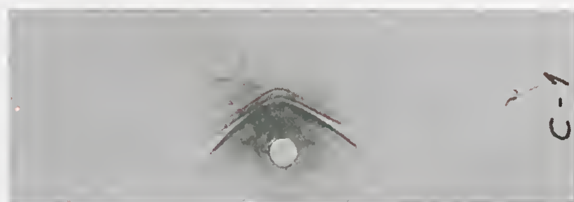



Fig. 14 — LÂMINA N.º C-1. Dupla difusão em gel de ágar, entre a solução de veneno de *B. alternatus* a 2% e o antiveneno específico purificado.




Fig. 15 — LÂMINA N.º C-3. Dupla difusão em gel de ágar, entre a solução de veneno de *B. insularis* a 2% e o antiveneno específico purificado.

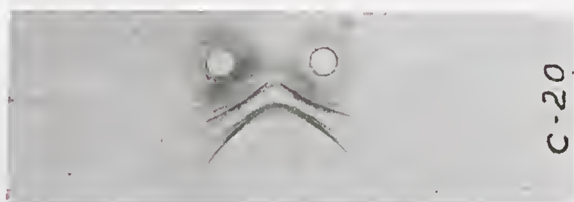



Fig. 16 — LÂMINA N.º C-20. Dupla difusão em gel de ágar, entre a solução de veneno de *B. jararacussu* a 2% e o antiveneno específico purificado.




Fig. 17 — LÂMINA N.º C-52. Dupla difusão em gel de ágar, entre a solução de veneno de *B. moojeni* a 2% e o antiveneno específico purificado.

SILES VILLARROEL, M., ZELANTE, F., FURLANETTO, R. S. & ROLIM ROSA, R. — Contribuição ao estudo imunoquímico de venenos botrópicos. I — Análise comparativa dos componentes antigênicos de seis espécies de venenos frente a seus respectivos antivenenos, através das técnicas de dupla difusão e imunoeletroforese em gel de ágar.

*Mem. Inst. Butantan, 38*: 13-30, 1974.

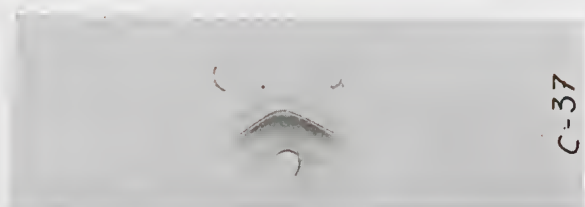



Fig. 18 — LÂMINA N.º C-37. Dupla difuão cm gel de ágar, entre a soluçã) de veneno de *B. cotiara* a 2% e o antiveneno específico purificado.

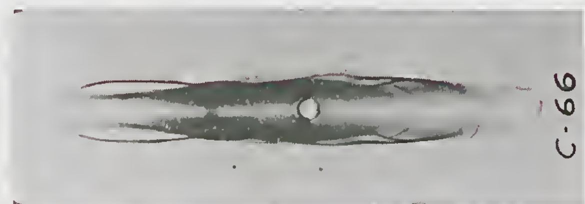



Fig. 19 — LÂMINA N.º C-66. Imunoeletroforese entre a solução de veneno de *B. jararaca* a 2% e o antiveneno específico purificado.

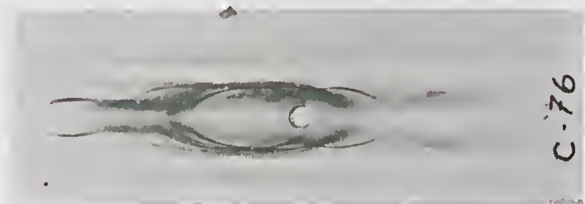



Fig. 20 — LÂMINA N.º C-76. Imunoelctroforese entrc a solução de veneno de *B. alternatus* a 2% e o antivcneno específico purificado.

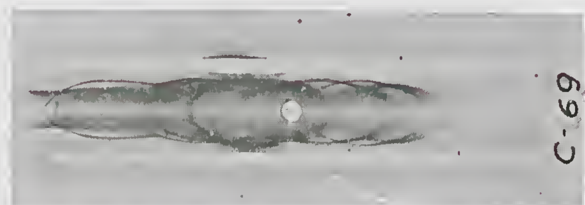



Fig. 21 — LÂMINA N.º C-69. Imunoeletroforese entre a solução de veneno dc *B. insularis* a 2% e o antiveneno específico purificado.

SILES VILLARROEL, M., ZELANTE, F., FURLANETTO, R. S. & ROLIM ROSA, R. — Contribuição ao estudo imunoquímico de venenos botrópicos. I — Análise comparativa dos componentes antigênicos de seis espécies de venenos frente a seus respectivos antivenenos, através das técnicas de dupla difusão e imunoeletroforese em gel de ágar.

*Mem. Inst. Butantan, 38*: 13-30, 1974.

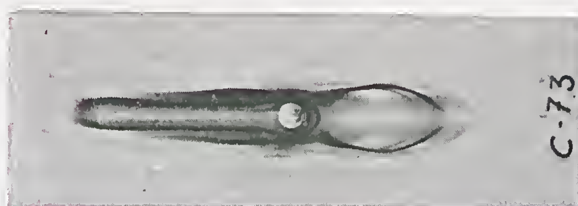



Fig. 22 — LÂMINA N.º C-73. Imunoeletroforese entre a solução de veneno de *B. jararacussu* a 2% e o antiveneno específico purificado.

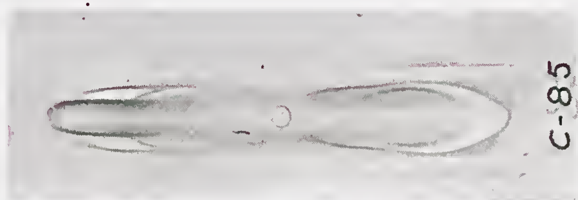



Fig. 23 — LÂMINA N.º C-85. Imunoeletroforese entre a solução de veneno de *B. moojeni* a 2% e o antiveneno específico purificado.




Fig. 24 — LÂMINA N.º F-19. Imunoeletroforese entre a solução de veneno de *B. cotiara* a 2% e o antiveneno específico purificado.

Os resultados expostos demonstram mais uma vez que submetendo-se o veneno à corrida eletroforética e em seguida realizando a imunodifusão com o antiveneno purificado, obtém-se sempre um número maior de linhas de precipitação, quando se comparam esses resultados com o número de linhas obtidas na reação de dupla difusão em gel de ágar.

Por outro lado, comparando os resultados das tabelas II e III verifica-se que os antivenenos purificados, provavelmente por estarem mais concentrados, exteriorizam de um modo geral, através das duas técnicas empregadas, sempre um aumento do número de linhas de precipitação.

## DISCUSSÃO

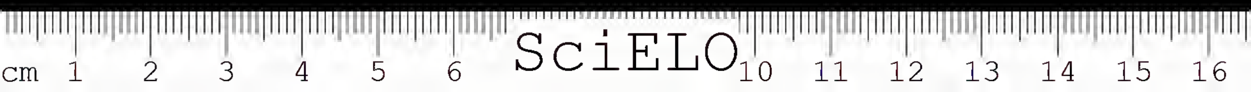
*Análise comparativa entre o número de linhas de precipitação obtidas na dupla difusão em gel de ágar e o número de linhas obtidas na imunoeletroforese, entre os venenos e os respectivos antivenenos específicos "in natura" e também com os antivenenos purificados.*

A execução dos modelos experimentais para as reações de dupla difusão e imunoeletroforese em gel de ágar, foram precedidas pelo doseamento "in vivo" através do método de Vital Brazil, cujos títulos estão apresentados na tabela I, no capítulo "Material e Métodos". A análise da tabela II nos demonstra que as reações entre o veneno e o respectivo antiveneno específico, apresentam sempre um número maior de linhas de precipitação na imunoeletroforese, do que na dupla difusão em gel de ágar; assim por exemplo, a reação entre o veneno e o respectivo antiveneno de *B. jararaca*, resulta em nove linhas de precipitação pela reação de dupla difusão em gel de ágar e de 16 linhas de precipitação na de imunoeletroforese. Esta melhor caracterização e melhor separação das linhas, observadas através da imunoeletroforese, se confirma para as demais reações por nós realizadas. De uma forma constante, a imunoeletroforese sempre condicionou a uma melhor separação dos componentes antigênicos e a uma melhor visualização das linhas de precipitação.

Os antivenenos purificados, também foram submetidos às reações de dupla difusão e imunoeletroforese em gel de ágar. A análise da tabela III mostra os resultados obtidos. Mais uma vez se verifica que a imunoeletroforese é uma técnica que revela sempre maior número de linhas de precipitação, do que a dupla difusão em gel de ágar. Por outro lado, a comparação dos resultados constantes das tabelas II e III, referentes ao comportamento dos antivenenos "in natura" e antivenenos purificados, demonstra de uma forma uniforme, que as reações com os antivenenos purificados, apresentam um aumento do número de linhas de precipitação, quer na reação de dupla difusão em gel, quer na imunoeletroforese. Evidentemente os soros purificados, sendo mais concentrados em anticorpos, permitem revelar maior número de linhas de precipitação do que os soros "in natura", onde alguns anticorpos não atingem uma concentração suficiente para exteriorizar o fenômeno de precipitação, quando frente ao antígeno.

A comparação dos resultados das provas realizadas com antivenenos "in natura" e purificados, foi feito com o objetivo de verificar se estes não teriam perdido alguns anticorpos, visto que a purificação e concentração pelo método de Pope, controlados pela eletroforese, apresentam somente uma banda, correspondente à fração gama globulínica. Os resultados obtidos nesta comparação, nos permitem crer que os anticorpos antivenenos estão concentrados totalmente na zona eletroforética que





SILES VILLARROEL, M., ZELANTE, F., FURLANETTO, R. S. & ROLIM ROSA, R. — Contribuição ao estudo imunoquímico de venenos botrópicos. I — Análise comparativa dos componentes antigênicos de seis espécies de venenos frente a seus respectivos antivenenos, através das técnicas de dupla difusão e imunoeletroforese em gel de ágar.

*Mem. Inst. Butantan, 38*: 13-30, 1974.

engloba as várias globulinas localizadas na região gama da eletroforese, visto que, sistematicamente foi obtido maior número de linhas de precipitação com os soros purificados.

## CONCLUSõES

1. A aplicação de micrométodos nas técnicas de dupla difusão e imunoeletroforese em gel de ágar, permitiram separar satisfatoriamente os componentes antigênicos das seis espécies de venenos estudados;
2. a utilização da técnica de imunoeletroforese em gel de ágar para a análise dos componentes antigênicos de venenos ofídicos, proporcionou a evidenciação de maior número de frações, do que quando feita através da dupla difusão em gel de ágar;
3. os antivenenos purificados pelo método de Pope, modificado por Furlanetto (1961), quando submetidos às duas técnicas aplicadas (dupla difusão e imunoeletroforese em gel de ágar), evidenciaram um maior número de componentes antigênicos do que os antivenenos "in natura".

*SUMMARY* — The authors analysed comparatively the antigenic components of 6 types of bothropic venoms, crude and purified, by the micromethods of Ouchterlony, and of Grabar and Williams.

They came to the conclusion that the applied methodology, mainly immunoelectrophoresis, allowed the achievement of satisfactory results as for the antigenic component separation. Purified antivenoms granted better results for antigenic component characterization than crude antivenoms.

*UNITERMS* — *Bothrops* venoms; double diffusion in agar-gel of *Bothrops* venom; immunoelectrophoresis of *Bothrops* venom.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BOUQUET, P.; DETRAIT, J. & FARZAPAY, R. — Recherches biochimiques e immunologiques sur le venin des serpents. *Ann. Inst. Pasteur, 116* (4): 521-542, 1969.
2. FARMACOPÉIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL. 2.ª ed. Rio de Janeiro, Ministério da Saúde, 1959, p. 471.
3. FERRI, R. G. — *Natureza dos anticorpos nas diversas fases de imunização e propriedades dos fragmentos mono e bivalentes.* São Paulo, 1967. p. 43-45 (Tese — Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo).
4. FERRI, R. G. — *Curso de eletroforese, imunoeletroforese e Imunodifusão.* São Paulo, Departamento de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 1968. (Apostila).
5. FERRI, R. G. & COSSERMELLI, W. — Analyse immuno-eletrophorétique. Micro et macro méthodes. *Rev. franç. Étud. clin. biol., 9*: 134-138, 1964.
6. FURLANETTO, R. S. — *Estudo sobre a preparação do soro antiloxoscélico.* São Paulo, 1961. p. 64-65 (Tese — Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo).
7. FURLANETTO, R. S. — *Emprego de camundongos tratados com dose preparatória de venenos bothrópicos para a avaliação de DL50 desses venenos.* São Paulo, 1965. p. 8-9. (Tese — Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo).





8. GONÇALVES, J. M. — *Estudos sobre crotamina* — Ribeirão Preto, 1961. p. 7-9. (Tese — Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo).

9. GRASSET, E.; BRECHBUHLER, T.; SCHWARTZ, D. E. & PONGRATZ, E. — Comparative analysis and electrophoretic fractionations of snake venoms with special reference to Vipera russelli and Vipera aspis venoms. In: BUCKLEY, E. E. & PORGES, N., eds. *Venoms. Washington*, 1956a. p. 153-169. (American Association for the Advancement of Science. Publication n.º 44).

10. GRASSET, E.; PONGRATZ, E. & BRECHBUHLER, T. — Analyse immunochimique des constituants des venins de serpents par la méthode de précipitation en milieu gélifié. *Ann. Inst. Pasteur, 91*: 162-186, 1956b.

11. GRABAR, P. & WILLIAMS, C. A., JR. — Méthode permettant l'étude conjugée des propriétes électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. Application au sérum sanguin. *Biochim, biophys. Acta* (Amst), *10*: 193-194, 1953.

12. GRABAR, P. & WILLIAMS, C. A., JR. — Méthode immunoélectrophorétique d'analyse de mélanges de substances antigéniques. *Biochim. biophys. Acta* (Amst), *17*: 67-74, 1955.

13. JOUANNET, M. — L'analyse immunoélectrophorétique appliquée aux venin de serpents. *Toxicon 5*: 191-199, 1968.

14. OUCHTERLONY, O. — In vitro method for testing the toxin producing capacity of diphtheria bacteria. *Acta path. microbiol. scand., 25*: 186-189, 1948.

15. OUCHTERLONY, O. — Antigen-antibody reactions in gels. *Acta path. microbiol. scand., 26*: 507-515, 1949.

16. POPE, C. G. — Disagregation of proteins by enzimes. *Brit. J. exp. Path., 19*: 245-251, 1938.

17. POPE, C. G. — The action of proteolytic enzymes of the antitoxins and proteins in immune sera. II. Heat Denaturation after partial enzyme action. *Brit. J. exp. Path., 20*: 201-212, 1939.

18. RASCOVSKY, S. & SCAVINI, L. M. — Estudio de la antigenicidad de los venenos ofídicos. *An Soc. cient. argent. 178*: 51-58, 1964.

19. ROSENFELD, G.; KELEN, E. M. A. & NUDEL, F. — Neutralização cruzada do poder coagulante de venenos ofídicos com soros antivenenos. *Ciência e cultura, 14*: 254-255, 1962.

20. SCAVINI, L. M. & FERRARESI, R. W. — Capacidad de protección y coincidencias antigénicas de sueros antiofídicos. *An. Soc. cient. argent., 174*: 87-99, 1962.

21. SCHENBERG, S. — Estudo comparativo da composição do veneno de Bothrops neuwiedii em placas de Cuchterlony. *Ciência e Cultura, 10*: 163-164, 1958.

22. SCHENBERG, S. Análise imunológica (micro-difusão em gel) de venenos individuais de Bothrops jararaca. *Ciência e Cultura, 13*: 225-230, 1961.

23. SCHENBERG, S. — Immunological (Ouchterlony method) identification of intrasubspecies qualitative differences in snake venom composition. *Toxicon, 1*: 67-75, 1963.

24. SILES VILLARROEL, M. — *Contribuição ao estudo de venenos de serpentes do Gênero Bothrops* (*B. jararaca, B. alternatus, B. insularis, B. jararacussu, B. atrox e B. cotiara*). São Paulo, 1972 (Tese — Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo).

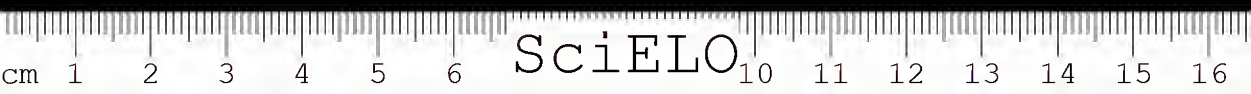
25. SILES VILLARROEL, M.; ROLIM ROSA, R.; FURLANETTO, R. S. & ZELANTE, F. Estudo eletrofético em "Cellogel" de venenos do gênero *Bothrops*. Mem. Inst. Butantan, *37*:83-90, 1973.

26. SIMON, J.; BRISBOIS, L. & GILLO, L. — Fractionation of cobra venom by electrofocusing. *J. Chromatog., 44*: 209-211, 1969.

27. URIEL, J.; SANTINA, D. M. & RIZZO, E. — Caracterisation d'enzimes dans le venin de Bothrops jararaca para les méthodes d'immunodiffusion. *Bull. Soc. Chim. biol.* (Paris) *50*: 938-940, 1968.

Recebido para publicação em 15-V-1974 e aceito em 15-X-1974.





Mem. Inst. Butantan
38: 31-40, 1974

# CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO IMUNOQUÍMICO DE VENENOS BOTRÓPICOS

## II. *Análise comparativa dos componentes antigênicos comuns de seis espécies de venenos botrópicos.*

MEDARDO SILES VILLARROEL*
REYNALDO SCHWINDT FURLANETTO**
RAYMUNDO ROLIM ROSA***
FLÁVIO ZELANTE****
JOSÉ NAVAS*****

*RESUMO* — Através de reações cruzadas, com o emprego de antivenenos específicos purificados e de técnicas de imunoeletroforese e de dupla difusão em gel de ágar, os autores verificaram a existência de componentes antigênicos comuns em venenos de seis espécies de serpentes do gênero *Bothrops*. Concluem, baseados nos resultados obtidos com a aplicação das duas técnicas, ser o veneno da espécie *B. alternatus* aquele que mais se aproxima antigenicamente ao veneno de B. *jararaca;* por outro lado, o veneno de *B. jararacussu* é aquele que mais se distancia.

*UNITERMOS* — Venenos botrópicos; imunoeletroforese e dupla difusão em gel de ágar de venenos botrópicos; componentes antigênicos comuns em venenos botrópicos.

## INTRODUÇÃO

Em trabalho anterior (Siles Villarroel e col. 1974), com a utilização de duas técnicas imunoquímicas, verificaram os componentes antigênicos de seis venenos botrópicos, utilizando antivenenos específicos, "in natura" e purificados, estabelecendo ainda, uma comparação entre os resultados obtidos com a aplicação das duas metodologias.

Uma revisão dos trabalhos publicados revela que poucos pesquisadores se preocuparam com o estudo de componentes antigênicos de venenos ofídicos, principalmente dos venenos de serpentes do gênero *Bothrops*. Mesmo dentre aqueles que estudaram esses venenos, a maioria se preocupou em verificar a existência de componentes comuns, através de reações de neutralização "in vivo" ou então, mais raramente, "in vitro". Rosenfeld e col. (1962), verificaram que o antiveneno de *B. cotiara* teria a capacidade de neutralizar "in vitro" a atividade coagulante dos venenos das demais serpentes do gênero *Bothrops,* sem necessariamente neutralizar outras atividades tóxicas. Inexistem na literatura pertinente,

* Ex-assistente da Seção de Imunologia do Instituto Butantan e Professor Assistente Doutor do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da U.S.P.
** Atual Diretor do Instituto de Ciências Biomédicas da U.S.P. e Professor Catedrático do Departamento de Microbiologia e Imunologia do mesmo Instituto.
*** Diretor do Serviço de Imunologia do Instituto Butantan e Professor Assistente Doutor do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da U.S.P.
**** Professor Assistente Doutor do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da U.S.P.
***** Chefe do Setor de Imunização do Instituto Butantan.

Endereço para correspondência:
C.P. 4365 — São Paulo, Brasil.

trabalhos que revelem a existência de componentes antigênicos comuns, em venenos de serpentes, através da aplicação das técnicas imunoquímicas, isto é, a imunoeletroforese e a dupla difusão em gel de ágar. Bouquet e col. (1969) quer nos parecer serem os únicos que aplicaram as duas metodologias no estudo do veneno de *N. nigricollis*. Verificaram que o componente α toxina está presente em outros venenos de serpentes do mesmo gênero e, mais raramente, nos venenos de outros gêneros mais distantes.

Baseados nestes aspectos, nos propusemos agora, utilizando da mesma metodologia aplicada em trabalho anterior (Siles Villarroel e col., 1974), verificar a presença de componentes antigênicos comuns em seis venenos de serpentes do gênero *Bothrops*, através do emprego de antivenenos purificados pelo método de Pope modificado por Furlanetto (1961) visto que tal tratamento do soro hiperimune mostrou-se superior para os fins colimados.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para o desenvolvimento do presente trabalho, utilizamo-nos do mesmo material e dos mesmos métodos já descritos anteriormente (Siles Villarroel e col., 1974). Acreditamos útil destacar que:

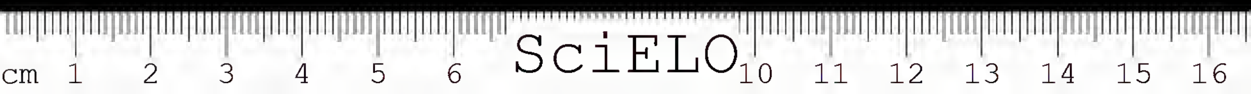
1. foram utilizadas soluções a 2% dos seguintes venenos: *B. jararaca, B. alternatus, B. insularis, B. jararacussu, B. moojeni* e *B. cotiara;*
2. foram utilizados os respectivos antivenenos específicos purificados, em que 1,0 ml neutralizava 4 mg de veneno;
3. quando da utilização da imunoeletroforese, padronizamos a colocação da solução de veneno no orifício central num volume de, aproximadamente, 0,015 ml, o antiveneno específico na fenda superior e, o antiveneno não específico, na fenda inferior, ambos num volume de 0,1 ml;
4. quando da utilização da dupla difusão em gel de ágar, padronizamos em todas as reações, a colocação do antiveneno na perfuração inferior; no orifício superior esquerdo colocamos a solução do veneno específico e no orifício superior direito a solução do veneno não específico. As soluções de veneno e os antivenenos, foram depositadas num volume de 0,02 ml.

## RESULTADOS

*Análise imunoeletroforética dos componentes antigênicos comuns ao veneno de* B. jararaca *e aos demais venenos botrópicos reveláveis através seus respectivos antivenenos purificados.*

Com o intuito de analisarmos os componentes antigênicos comuns aos vários venenos botrópicos tomamos por base o veneno de *B. jararaca*,





visto ser esta espécie a mais estudada e a mais freqüente entre nós. Decidimos então realizar a corrida eletroforética do veneno de *B. jararaca*, e em seguida submetê-lo à dupla difusão, aplicando à fenda superior, o antiveneno específico purificado e na fenda inferior outro antiveneno purificado, porém não específico da espécie. Tal modelo experimental foi escolhido em face da possibilidade de que as linhas de precipitação formadas, pudessem nos levar à uma análise de identidades antigênicas. Isso seria talvez possível, se os arcos formados, por sua curvatura, localização e extensão, pudessem caracterizar identidades totais, ou então pudessem indicar possíveis identidades parciais.

A tabela I resume os resultados encontrados e foi delineada das figuras 1 a 5.

TABELA I

Resultados das reações de imunoeletroforese em gel de ágar, entre a solução de veneno de *B. jararaca* a 2% frente ao antiveneno específico na fenda superior e outros antivenenos inespecíficos à espécie, na fenda inferior (antivenenos purificados neutralizando sempre 4 mg/ml).

| Lâminas demonstrativas | N.º de linhas obtidas frente ao antiveneno específico | N.º de linhas obtidas frente aos antivenenos de: | | Identidades antigênicas | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | possível identidade total | possível identidade parcial |
| D-76 | 16 | *B. alternatus* | 15 | 7 | 8 |
| D-45 | 16 | *B. insularis* | 14 | 7 | 7 |
| D-52 | 16 | *B. jararacussu* | 12 | 9 | 3 |
| D-6 | 16 | *B. moojeni* | 13 | 9 | 4 |
| D-83 | 16 | *B. cotiara* | 14 | 9 | 5 |

As figuras 1 a 5 ilustram os resultados consubstanciados pela tabela I.

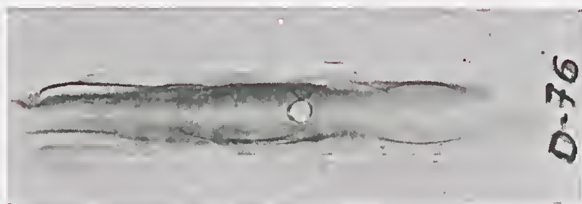



Fig. 1 — LÂMINA N.º D-76. Imunoeletroforese entre a solução de veneno de *B. jararaca* a 2% e o antiveneno específico purificado na fenda superior e o antiveneno purificado de *B. alternatus* na fenda inferior.

SILES VILLARROEL, M., FURLANETTO, R. S., ROLIM ROSA, R., ZELANTE, F. & NAVAS, J. — Contribuição ao estudo imunoquímico de venenos botrópicos. II — Análise comparativa dos componentes antigênicos comuns de seis espécies de venenos.

*Mem. Inst. Butantan*, 38: 31-40, 1974.

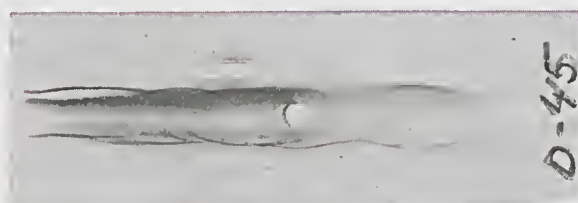



Fig. 2 — LÂMINA N.º D-45. Imunoeletroforese entre a solução de veneno de *B. jararaca* a 2% e o antiveneno específico purificado na fenda superior e o antiveneno purificado de *B. insularis* na fenda inferior.

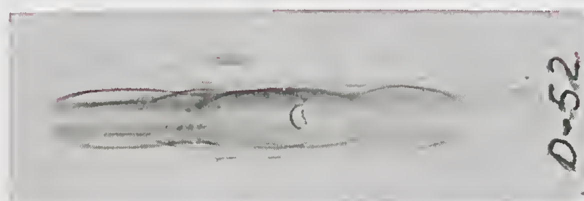



Fig. 3 — LÂMINA N.º D-52. Imunoeletroforese entre a solução de veneno de *B. jararaca* a 2% e o antiveneno específico purificado na fenda superior e o antiveneno purificado de *B. jararacussu* na fenda inferior.

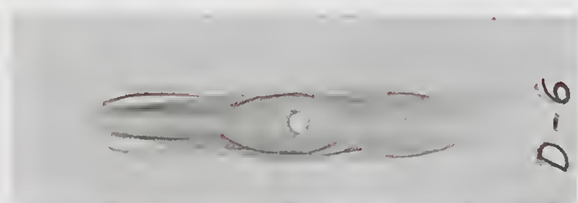



Fig. 4 — LÂMINA N.º D-6. Imunoeletroforese entre a solução de veneno de *B. jararaca* a 2% e o antiveneno específico purificado na fenda superior e o antiveneno purificado de *B. moojeni* na fenda inferior.

SILES VILLARROEL, M., FURLANETTO, R. S., ROLIM ROSA, R., ZELANTE, F. & NAVAS, J. — Contribuição ao estudo imunoquímico de venenos botrópicos. II — Análise comparativa dos componentes antigênicos comuns de seis espécies de venenos.

*Mem. Inst. Butantan*, 38: 31-40, 1974.

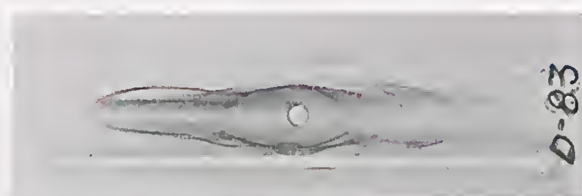



Fig. 5 — LÂMINA N.º D-83. Imunoeletroforese entre a solução de veneno de *B. jararaca* a 2% e o antiveneno específico purificado na fenda superior e o antiveneno purificado de *B. cotiara* na fenda inferior.

É bom relembrar que o objetivo do emprego deste modelo experimental, foi o de estudar os componentes antigênicos comuns com identidade total ou parcial. Realmente a tabela I mostra que foi possível com certa segurança analisar as identidades pretendidas. Quando os arcos tinham uma evidente tendência a se fecharem (em alguns casos foi obtido o fechamento completo), ou ainda, por sua localização e extensão, nestes casos considerávamos identidade total. Quando as linhas de precipitação não apresentavam exatamente estas características considerávamos como possível identidade parcial. Tal critério de avaliação é que permitiu a confecção da mencionada tabela I.

*Análise dos componentes antigênicos comuns entre o antiveneno de* B. jararaca *e os vários venenos botrópicos em estudo, através da dupla difusão em gel de ágar*

Tal metodologia permitiu comparar através do antiveneno de *B. jararaca*, os componentes antigênicos comuns dos demais venenos.

A tabela II resume os resultados encontrados e foi delineada das figuras 6 a 10.

TABELA II

Resultados das reações de dupla difusão em gel de ágar, entre o antiveneno de *B. jararaca* purificado neutralizando 4 mg/ml e os vários venenos de *Bothrops* a 2%.

| Lâminas demonstrativas | Venenos comparados frente ao antiveneno de *B. jararaca* | N.º de linhas obtidas na reação específica contra o veneno de *B. jararaca* | N.º de linhas obtidas frente ao outro veneno | Identidades antigênicas | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Identidade total | Identidade parcial |
| C-57 | *B. alternatus* | 10 | 9 | 6 | 3 |
| D-4 | *B. insularis* | 10 | 8 | 6 | 2 |
| D-54 | *B. jararacussu* | 10 | 7 | 5 | 2 |
| C-75 | *B. moojeni* | 10 | 9 | 6 | 3 |
| C-77 | *B. cotiara* | 10 | 8 | 5 | 3 |

SILES VILLARROEL, M., FURLANETTO, R. S., ROLIM ROSA, R., ZELANTE, F. & NAVAS, J. — Contribuição ao estudo imuniquímico de venenos botrópicos. II — Análise comparativa dos componentes antigênicos comuns de seis espécies de venenos.

*Mem. Inst. Butantan*, 38: 31-40, 1974.

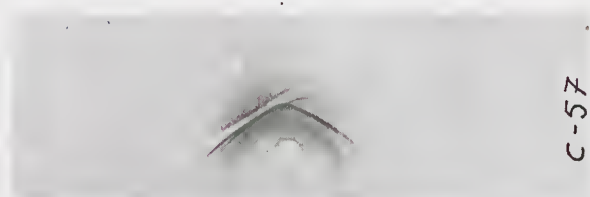



Fig. 6 — LÂMINA N.º C-57. Dupla difusão em gel de ágar entre o antiveneno de *B. jararaca* purificado, frente aos venenos de *B. jararaca* e *B. alternatus* em solução a 2%.

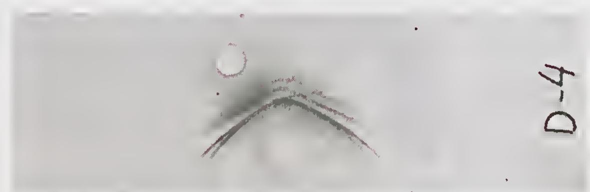



Fig. 7 — LÂMINA N.º D-4. Dupla difusão em gel de ágar entre o antiveneno de *B. jararaca* purificado, frente aos venenos de *B. jararaca* e *B. insularis* em solução a 2%.

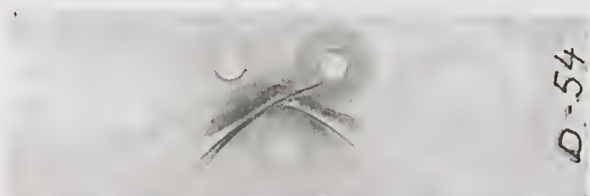



Fig. 8 — LÂMINA N.º D-54. Dupla difusão em gel de ágar entre o antiveneno de *B. jararaca* purificado, frente aos venenos de *B. jararaca* e *B. jaracussu* em solução a 2%.

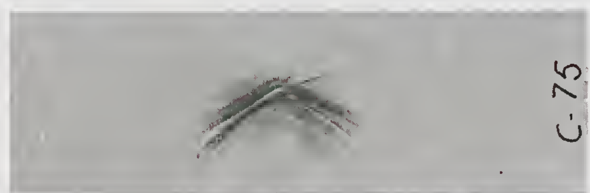



Fig. 9 — LÂMINA N.º C-75. Dupla difusão em gel de ágar entre o antiveneno de *B. jararaca* purificado, frente aos venenos de *B. jararaca* e *B. moojeni* em solução a 2%.

SILES VILLARROEL, M., FURLANETTO, R. S., ROLIM ROSA, R., ZELANTE, F. & NAVAS, J. — Contribuição ao estudo imunoquímico de venenos botrópicos. II — Análise comparativa dos componentes antigênicos comuns de seis espécies de venenos.

*Mem. Inst. Butantan*, 38: 31-40, 1974.




Fig. 10 — LÂMINA N.º C-77. Dupla difusão em gel de ágar entre o antiveneno de *B. jararaca* purificado, frente aos venenos de *B. jararaca* e *B. cotiara* em solução a 2%.

Os resultados resumidos nas tabelas I e II mostram que a técnica de Ouchterlony, revela sempre menor número de linhas de precipitação do que a técnica de imunoeletroforese do veneno, confirmando as nossas observações anteriores (Siles Villarroel e col., 1974). Obviamente o número de linhas com identidade é também menor.

## DISCUSSÃO

A análise da tabela I corresponde ao estudo comparativo dos resultados das reações de imunoeletroforese em gel de ágar entre o veneno de *B. jararaca* e os antivenenos, específico e não específico. A técnica por nós utilizada permite caracterizar um maior número de componentes antigênicos dos venenos. Tal fato deveria também mostrar um número maior de componentes antigênicos comuns aos outros venenos, detectáveis através dos respectivos antivenenos. Assim sendo, poderíamos também analisar as possíveis identidades totais e parciais.

Ainda, os dados constantes na tabela I já referida, demonstram que os venenos de *B. alternatus*, *B. insularis*, *B. cotiara* e *B. moojeni*, representados por seus antivenenos, são os que apresentam maior número de componentes antigênicos em comum, com o veneno de *B. jararaca*. Nessa ordem de idéias, o veneno de *B. jararacussu*, seria aquele que possui um menor número de componentes antigênicos em comum com o veneno de *B. jararaca*.

Acreditamos, baseados nos dados da literatura, ter sido esta, a primeira vez que foi utilizado tal modelo experimental no estudo dos venenos ofídios, principalmente em espécies do gênero *Bothrops*.

A técnica de dupla difusão em gel de ágar, foi desenvolvida com a finalidade de compararmos os seus resultados, com aqueles obtidos pela imunoeletroforese. A técnica de Ouchterlony já realizada nos trabalhos anteriores (Siles Villarroel, 1972 e Siles Villarroel e col., 1974), demonstraram que se obtém sempre um número menor de linhas de precipitação, quando estas são comparadas com o número de linhas obtidas pela técnica de imunoeletroforese. No entanto, a dupla difusão em gel de

ágar, tem sido o método clássico utilizado para o estudo dos componentes antigênicos comuns, assim como para o estudo das identidades antigênicas dos componentes, quer seja total, parcial ou de falta de identidade. Acreditamos pois, ser imperativa, a análise comparativa destes resultados, com os da imunoeletroforese.

A tabela II, que corresponde aos resultados das reações de dupla difusão em gel de ágar, entre o antiveneno de *B. jararaca* e o veneno específico, comparativamente com os outros venenos estudados, demonstra que os venenos de *B. alternatus*, *B. moojeni*, *B. insulares* e *B. cotiara*, são os que apresentam maior número de componentes antigênicos em comum com o veneno de *B. jararaca*, ao passo que, o veneno de *B. jararacussu* é o que possui menor número de componentes antigênicos em comum com o veneno de *B. jararaca*.

A análise comparativa dos resultados constantes nas tabelas I e II, demonstra que realmente os quatro venenos já assinalados anteriormente, são aqueles que mais se aproximam antigenicamente do veneno de *B. jararaca*, e que o veneno de *B. jararacussu*, é aquele que mais se distancia.

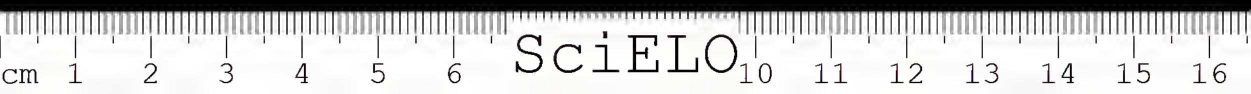
O fato do veneno de *B. moojeni* aparecer na imunodifusão como próximo ao de *B. jararaca*, o que não é confirmado pela imunoeletroforese, pode ser interpretado através do fato de que o primeiro método revela sempre menor número de linhas de precipitação, o que faz pressupor que na técnica de Ouchterlony, haja sobreposição de algumas linhas de precipitação o que dificultaria a diferenciação. Este fato provavelmente ocorre com menor freqüência na técnica de Grabar & Williams, em virtude da prévia corrida eletroforética do veneno, o que permite melhor separação de seus componentes antigênicos.

## CONCLUSÕES

Tomando-se por base os resultados da análise comparativa entre os componentes antigênicos comuns das seis espécies de venenos botrópicos estudados, permite concluir que:

1. A utilização da técnica de imunoeletroforese para a análise dos componentes antigênicos comuns de venenos ofídicos, proporciona a evidenciação de maior número de frações comparáveis, do que quando feita através da dupla difusão em gel de ágar.
2. A imunoeletroforese aplicada nas condições deste trabalho permitiu constatar ser o veneno de *B. alternatus*, aquele que mais se aproxima do de *B. jararaca*, pois apresenta 15 componentes antigênicos relacionados; por outro lado, o veneno de *B. jararacussu*, com 12 componentes relacionados, é o que mais se distancia de *B. jararaca*.





3. A dupla difusão em gel de ágar, embora evidenciando menor número de componentes antigênicos, confirmou também ser o veneno de *B. alternatus*, aquele que mais se aproxima do de *B. jararaca*, apresentando por esta técnica somente nove componentes relacionados; também por este método, o veneno de *B. jararacussu* com sete componentes relacionados é o que mais se distancia de *B. jararaca*.

*SUMMARY* — Through cross reactions between 6 types of bothropic venoms and their respective specific purified antivenoms, the authors, with the aid of immunoelectrophoretic techniques, and double agar-gel diffusion, verified the existence of common antigenic components. Based on the results obtained through both techniques they conclude that the venom of the species *B. alternatus* is antigenically the closest to that of *B. jararaca*, whereas the venom of *B. jararacussu* is the most different.

*UNITERMS* — *Bothrops* venoms; immunoelectrophoresis and double agar-gel diffusion of *Bothrops* venoms; common antigenic components in *Bothrops* venoms.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BOUQUET, P.; DÉTRAIT, J. & FARZANPAY, R. — Recherches biochimiques et immunologiques sur le venin des serpents. *Ann. Inst. Pasteur, 116* (4): 521-542, 1969.

2. FURLANETTO, R. S. — *Estudo sobre a preparação do soro antiloxoscélico.* São Paulo, 1961. p. 64-65. [Tese-Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo].

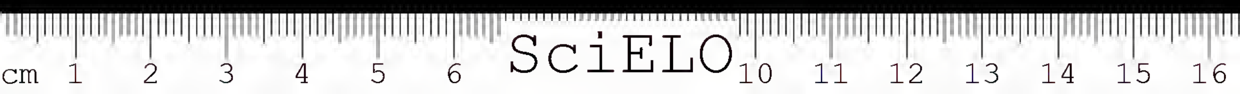
3. ROSENFELD, G.; KELEN, E. M. A. & NUDEL, F. — Neutralização cruzada do poder coagulante de venenos ofídicos com soros antivenenos. *Ciência e Cultura, 14:* 254-255, 1962.

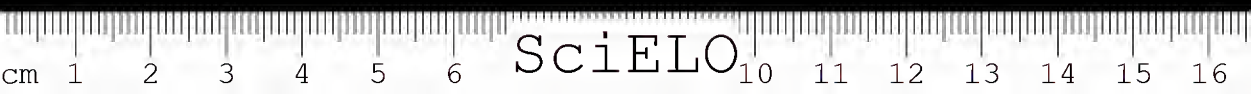
4. SILES VILLARROEL, M. — *Contribuição ao estudo de venenos de serpentes do gênero Bothrops (B. jararaca, B. alternatus, B. insularis, B. jararacussu, B. atrox e B. cotiara).* São Paulo, 1972. [Tese — Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo].

5. SILES VILLARROEL, M.; ZELANTE, F.; FURLANETTO, R. S. & ROLIM ROSA, R. — Contribuição ao estudo imunoquímico de venenos botrópicos. I. Análise comparativa dos componentes antigênicos de seis espécies de venenos frente a seus respectivos antivenenos, através das técnicas de dupla difusão e imunoeletroforese em gel de ágar. *Mem. Inst. Butantan, 38*: 13-30, 1974.

Recebido para publicação em 15-4-1974 e aceito para publicação em 15-X-1974.






cm 1 2 3 4 5 6
SciELO
10 11 12 13 14 15 16

Mem. Inst. Butantan
38: 41-50, 1974

# ESTUDO MORFOLÓGICO E HISTOQUÍMICO DA GLÂNDULA DE HARDER DE ALGUNS REPTÉIS BRASILEIROS. I. OPHIDEA.

RUBERVAL A. LOPES, CLEIDE DE OLIVEIRA, GERALDO M. CAMPOS E JAIME M. DE BARROS

Departamento de Ciências Morfológicas e Patologia da Faculdade de Farmácia e Odontologia de Ribeirão Preto

*RESUMO* — Os autores estudaram morfologicamente a glândula de Harder de algumas espécies de serpentes brasileiras e histoquimicamente as mucossubstâncias e algumas proteínas nessa glândula. Baseados nos resultados os autores concluiram que a glândula de Harder de todas as espécies estudadas é formada de células mucosserosas e que o produto de secreção dessas células é constituído de um complexo carboidrato-proteína e ácido siálico. Foi constatada a presença de ácido hialurônico nessas células.

*UNITERMOS* — Glândula de Harder de serpentes. Histoquímica de mucossubstâncias e proteínas. Determinação do tipo celular.

## INTRODUÇÃO

Meckel (1826) e Duvernoy (1832) descreveram, pela primeira vez, a glândula de Harder em ofídios sob a denominação de glândula lacrimal. Em 1873, Leydig descreveu-a como sendo a glândula da membrana nictitante; outra descrição da glândula foi a de Phisalix, em 1922; Smith e Bellairs (1947) descreveram a glândula histologicamente, chamando a atenção para o fato de somente parte da glândula localizar-se dentro da cavidade orbitária (todos cit. em 13).

Bellairs e Boyd (2), num trabalho exaustivo em oito famílias de serpentes, descreveram detalhadamente as relações da glândula de Harder e ductos com a membrana nictitante.

Estudos morfológicos e histoquímicos na glândula de Harder de ofídios foram realizados por Barros *et al.* (1) em *Eunectes murinus* e por Lopes *et al.* (7-8) em *Micrurus coralinus* e *Bothrops jararaca.*

O objetivo do presente trabalho é estudar a glândula de Harder de alguns ofídios das famílias Boidae, Colubridae, Elapidae e Viperidae, identificando o tipo celular aí existente, bem como detectar histoquimicamente, por meio de técnicas adequadas, o produto de secreção dessa glândula.

Endereço para correspondência:
Ruberval A. Lopes
Departamento de Ciências Morfológicas e Patologia
Faculdade de Farmácia e Odontologia de Ribeirão Preto
14.100 - Ribeirão Preto - SP.





## MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se para este estudo, os seguintes ofídios adultos, machos e fêmeas:

| *Família* | *Espécie* |
|---|---|
| Boidae: | *Constrictor constrictor* |
| | *Eunectes murinus* |
| | *Epicrates cenchria crassus* |
| Colubridae: | *Xenodon merremii* |
| Elapidae: | *Micrurus corallinus* |
| | *Micrurus frontalis* |
| Viperidae: | *Bothrops jararaca* |
| | *Bothrops alternatus* |
| | *Crotalus durissimus terrificus.* |

Os animais foram sacrificados por decapitação, sendo logo dissecadas as glândulas de Harder e imediatamente imersas em Alfac, durante 24 horas. Após a fixação, as peças foram incluídas em parafina.

Para a observação morfológica da glândula de Harder dos ofídios, foram utilizados os métodos da hematoxilina-eosina e tricrômico de Masson.

Para a pesquisa histoquímica das mucossubstâncias e proteínas, usaram-se as recomendações técnicas de Pearse (10), a menos que citada recomendação especial. Os métodos foram os seguintes: PAS (ácido periódico-Schiff), azul de alcian aos pH = 2,5 e 0,5, azul de alcian + PAS, metacromasia aos pH = 3,4 — 2,2 — 1,7, segundo Lison (6). Como controle, utilizaram-se os seguintes métodos: amilase salivar, acetilação, metilação, metilação seguida de saponificação, ação da hialuronidase testicular e o teste de Quintarelli *et al.* (11). Para grupamento amino utilizou-se a técnica da aloxana-Schiff e, para aminoácidos, o método de Chèvremont *et al.* (3).

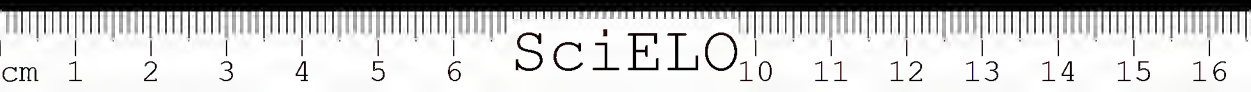
Para a caracterização da célula secretora adotou-se o critério de Gabe e St. Girons (4). Por esse método, classificaram-se quatro tipos celulares: mucoso, mucosseroso, seromucoso e seroso. Os critérios para essa classificação são fornecidos pela alcianofilia, positividade ao PAS e presença de proteína histoquimicamente detectável.

## RESULTADOS

### *Resultados morfológicos*

*Família Boidae* — A glândula de Harder da cobra *Constrictor constrictor* é relativamente grande, apresentando parte de sua estrutura fora da cavidade orbitária. É uma glândula do tipo túbulo-acinosa composta e está envolvida externamente por uma cápsula fina de tecido conjuntivo,





a qual emite fibras colágenas delicadas que envolvem os ácinos. Os ácinos são pequenos e constituídos por células prismáticas altas, com citoplasma repleto de grânulos pequenos e acidófilos, e núcleo ovóide, de cromatina densa, localizado na porção basal da célula (Fig. 1).

Essas células acinares lançam seu produto de secreção em ductos pequenos, revestidos por epitélio simples, prismático, com citoplasma celular ligeiramente basófilo; esses ductos vão se reunindo para formar ductos maiores que, por sua vez, desembocam num ducto central grande, revestido de células epiteliais altas e acidófilas.

A glândula de Harder da cobra *Epicrates cenchria crassus* é muito semelhante à da *Constrictor*, apresentando, também, uma porção glandular extra-orbitária. Os ácinos são bastante semelhantes, porém suas células apresentam o núcleo com cromatina frouxa. O produto de secreção é lançado em ductos pequenos, revestidos por epitélio simples, cubóide, que vão se reunindo em ductos maiores, de células epiteliais prismáticas, e finalmente esse produto vai ter ao ducto excretor maior, revestido por epitélio plano estratificado (Fig. 2).

A glândula de Harder de *Eunectes murinus* é bem desenvolvida, sendo que sua porção maior localiza-se fora da cavidade orbitária. Seu padrão histológico é semelhante ao descrito para as duas espécies anteriores (Fig. 3 e 4).

*Família Colubridae* — A glândula de Harder da cobra *Xenodon merremii* divide-se em dois lobos distintos, unidos por uma fina ponte glandular. O lobo extra-orbitário é recoberto por uma cápsula espessa de tecido conjuntivo denso, ricamente vascularizado. Dessa cápsula partem fibras colágenas delicadas que irão envolver os ácinos glandulares. O quadro histológico é bem semelhante ao das serpentes da família Boidae, sendo essa glândula também túbulo-acinosa composta. Os ácinos são pequenos e constituídos por células altas, de citoplasma contendo numerosos grânulos acidófilos, com núcleo ovóide e de cromatina densa, localizado na região basal.

O produto de secreção é lançado em ductos, de um modo semelhante ao das serpentes da família Boidae.

O lobo intra-orbitário é idêntico ao extra-orbitário.

*Família Elapidae* — A glândula de Harder de *Micrurus corallinus* é pouco desenvolvida, tendo também uma porção extra-orbitária. A cápsula que delimita a glândula é delgada e constituída por tecido conjuntivo denso, o qual emite fibras colágenas que delimitam os ácinos. Esses ácinos são pouco volumosos e suas células são prismáticas, apresentando núcleos esféricos na região basal, ricos em cromatina, e citoplasma granuloso e acidófilo. Os ductos são constituídos por células prismáticas, que vão se reunindo até formar um único ducto excretor (Fig. 5).

A glândula de Harder da serpente *Micrurus frontalis* é em tudo semelhante à anterior.

*Família Viperidae* — As glândulas de Harder das cobras *Bothrops jararaca, B. alternatus* e *Crotalus d. terrificus* são muito semelhantes constituídas por uma cápsula de tecido conjuntivo denso, a qual emite fibras colágenas que envolvem os ácinos. Os ácinos são grandes e constituídos por células prismáticas altas, de citoplasma fortemente acidófilo, com núcleos arredondados e localizados na região basal. Os ductos menores reúnem-se num único ducto excretor maior, de células epiteliais altas e citoplasma pouco acidófilo (Fig. 6).

## DISCUSSÃO

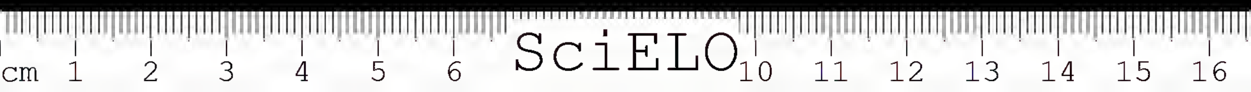
Nas serpentes a glândula de Harder geralmente é bem desenvolvida e, em algumas espécies, relativamente muito grande, mostrando-se muitas vezes maior que o bulbo ocular. Seus ductos excretores geralmente se reúnem na região anterior da órbita e descarrega o produto de secreção no ducto lacrimal que, nas serpentes, desemboca no espaço existente abaixo da membrana transparente. A glândula de Harder geralmente se localiza na parte mediana e posterior do bulbo ocular, usualmente abraçando o nervo óptico (2).

A glândula de Harder, nos ofídios, é predominante, e a glândula lacrimal, quando presente, é pobremente desenvolvida. Sua função ainda é motivo de controvérsias em algumas espécies. Entretanto para as serpentes, sua função parece ser bem específicas, podendo bem ser denominada "glândula nictitans" (12). A relação íntima da glândula de Harder com a membrana nictitante foi descrita por Loewenthal (1935, cit. em 2), tendo sugerido esse autor que a membrana nictitante jamais ocorreria na ausência da glândula de Harder. Walls (1942, cit. em 2) comentou que era a glândula de Harder que lubrificava o olho e não a lacrimal, em espécies cuja membrana nictitante estivesse ausente, substituída pela membrana transparente, como é o caso das serpentes.

Em algumas cobras primitivas (Boidae), a glândula de Harder tanto pode lançar seu produto de secreção diretamente no espaço localizado logo abaixo da membrana transparente como também pode fazê-lo no ducto lacrimal. As demais espécies de ofídios lançam o produto de secreção, através de um só ducto excretor, na porção superior do ducto lacrimal, não possuindo comunicação direta com o espaço existente sob a membrana transparente (2).

Analisando os resultados histoquímicos constantes na tabela 1, e tendo-se em vista o critério de Gabe e St. Girons (4), verificou-se que o tipo de célula secretora da glândula de Harder de todos os ofídios estudados compõe-se de um complexo carboidrato-proteína e ácido siálico, os quais são responsáveis pela reação positiva ao PAS e proteína histoquimi-





camente detectável (6-9), pela diminuição na coloração pelo azul de alcian a pH = 2,5 após hidrólise ácida (11), respectivamente. Devido à diminuição da alcianofilia após prévio tratamento com hialuronidase testicular e posterior coloração pelo azul de alcian a ph = 2,5, pode-se constatar a presença de ácido hialurônico nessas células (5). Estes resultados concordam com os de Lopes *et al.* (7-8) em *Micrurus corallinus* e *Bothrops jararaca* e Barros *et al.* (1) em *Eunectes murinus*.

*SUMMARY* — Morphological and histochemical study of the Harderian gland of brazilian reptilians. I. Ophidea.

The authors studied morphologically the Harderian gland of some species of brazilian snakes, and histochemically the mucosubstances and some protcins in this gland. Based on the results, the authors concluded: the Harderian gland of all species is formed by mucous-serous cells; the mucous-serous cells shows a carbohydrate-protein complex and sialic acid; those cells also produce hyaluronic acid.

*UNITERMS* — Snake's Harderian gland. Histochemical study of mucosubstances and proteins. Determination of the celular type.

## BIBLIOGRAFIA

1. BARROS, J. M.; LOPES, R. A.; CAMPOS, G. M. e DARUGE, A. D. — Estudo morfológico e histoquímico de polissacarídeos em glândulas cefálicas de *Eunectes murinus* (Ophidca, Boidae). *Ciência e Cultura, 25*: 151-156, 1973.
2. BELLAIRS, D. D'A., and BOYD, J. D. — The lachrymal apparatus in lizards and snakes. I. The brille, the orbital glands, lachrymal canaliculi and origin of the lachrymal duct. *Proc. Zool. Soc. Lond., 117*:81-108, 1947.
3. CHÈVREMONT, M., et FREDERIC, J. — Une nouvelle méthode histochimique de mise en évidence des substances à fonction sulphydrile. Application à l'epiderme, au poil et a la lecure. *Arch. Biol., 54*: 589-605, 1943.
4. GABE, M. et SAINT-GIRONS, H. — Donnés histologiques sur les glandes salivaires des Lépidosauriens. *Mém. Mus. nat. Hist. nat.* Paris, sér. A. Zool., *58*:1-112, 1969.
5. LEPPI, T. J. and STOWARD, P. J. — On the use of testicular hyaluronidase for identifying acid mucins in tissue sections. *J. Histochem. Cytochem., 13*: 406-407, 1965.
6. LISON, L. — *Histochimie et cytochimie animales.* 3.ª éd. Gauthier-Villars, Paris. 1960.
7. LOPES, R. A.; OLIVEIRA, C.; CAMPOS, M. N. M.; CAMPOS, S. and BIRMAN, E. G. — Morphological and histochemical study of cephalic glands of *Bothrops jararaca* (Ophidia, Viperidae). *Acta Zool., 55*:17-24, 1974.
8. LOPES, R. A.; VALERI, V.; CAMPOS, G. M.; LOPES, O. V. P. et FARIA, R. M. — Étude histochimique des mucopolysaccharides des glandes céphaliques de *Micrurus c. corallinus* (Ophidea, Elapidae). *Ann. d'Histochimie, 18*: 129-137, 1973.
9. McMANUS, J. F. A. and CASON, J. E. — Carbohydrate histochemistry studied by acetylation techniques. I. Periodic acid methods. *J. Exp. Med., 91*: 651-654, 1950.
10. PEARSE, A. G. E. — *Histochemistry: theoretical and applied.* 3th ed. Churchill, London. 1968.
11. QUINTARELLI, G.; TSUIKI, S.; HASHIMOTO, Y. and. PIGMAN, W. Studies of sialic acid-containing mucins in bovine submaxillary and rat sublingual glands. *J. Histochem. Cytochem., 9*: 176-183, 1961.
12. SHINODA, S. — Harder's glands in some mammals. *Biol. Abstracts, 36*: ref. 1170, 1961.
13. TAUB, A. M. — Ophidian cephalic glands. *J. Morph., 118*: 529-542, 1966.

Recebido para publicação em 15-III-1974 e aceito em 15-VI-1974.



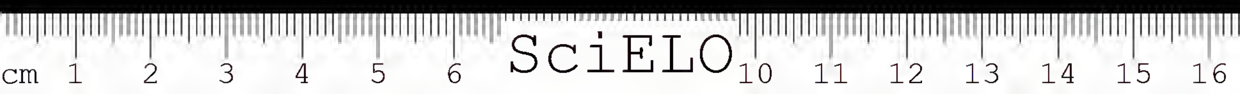


TABELA I

*Resultados da detecção histoquímica de mucossubstâncias e proteínas da glândula de Harder de alguns ofídios brasileiros*

| Reação / Espécie | Jibóia | Salamanta | Sucuri | Boipeva | Corais | Cascavel | Urutu | Jararaca |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| PAS | + | + | + | + | ++ | + | + | + |
| PAS após acetilação | − | − | − | − | − | − | − | − |
| PAS após amilase | + | + | + | + | ++ | + | + | + |
| Alcian blue a pH = 2,5 | ++ | + | + | + | + | + | + | + |
| AB após metilação | − | − | − | − | − | − | − | − |
| AB após metilação + saponificação | ++ | + | + | + | + | + | + | + |
| AB após hialuronidase | +± | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± |
| AB após hidrólise ácida | + | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± |
| AB a pH = 0,5 | − | − | − | − | − | − | − | − |
| AB a pH = 2,5 + PAS | azul | violeta | violeta | violeta | vermelho | violeta | violeta | violeta |
| Metacromasia pH = 3,4 | + | + | ± | + | + | + | + | + |
| 2,2 | − | − | − | − | − | − | − | − |
| 1,7 | − | − | − | − | − | − | − | − |
| Aloxana-Schiff | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Chèvremont | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± |

LOPES, R. A., OLIVEIRA, C., M. CAMPOS, G. & BARROS, J. M. — Estudo morfológico e histoquímico da Glândula de Harder de alguns répteis brasileiros. I — Ophidea.
*Mem. Inst. Butantan. 38*: 41-50, 1974

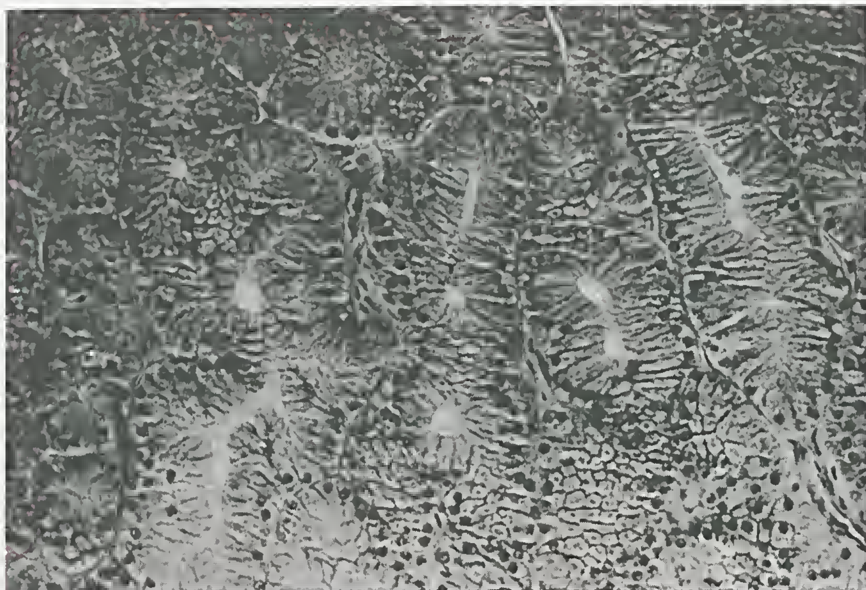


Fig. 1 — Glândula de Harder de *Constrictor constrictor* mostrando ácinos pequenos constituídos de células prismáticas altas com citoplasma repleto de grânulos pequenos e acidófilos e núcleo ovóide, de cromatina densa, localizado na porção basal da célula, após coloração pelo HE (400 X).

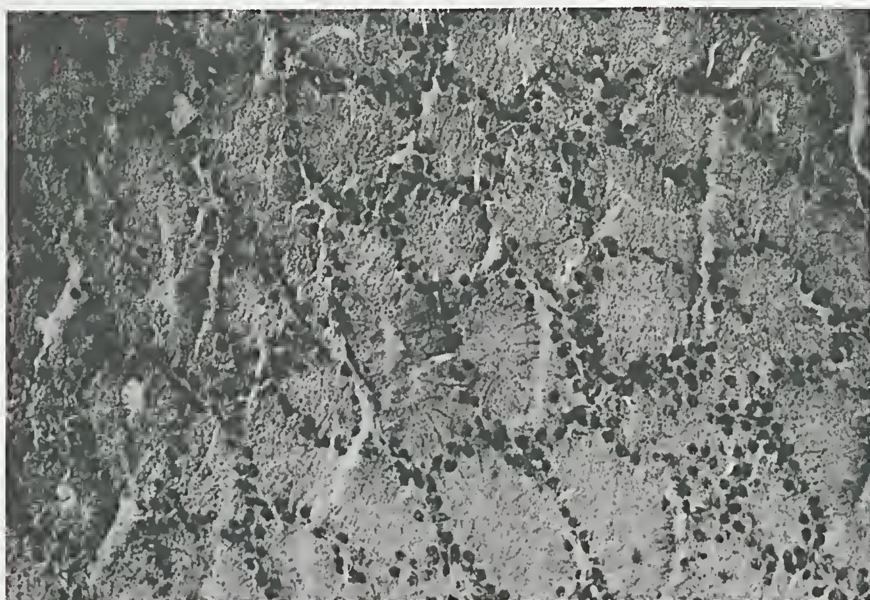


Fig. 2 — Glândula de Harder de *Epicrates cenchria crassus* mostrando ácinos pequenos constituídos de células com citoplasma repleto de grânulos acidófilos, após coloração pelo HE (400 X)

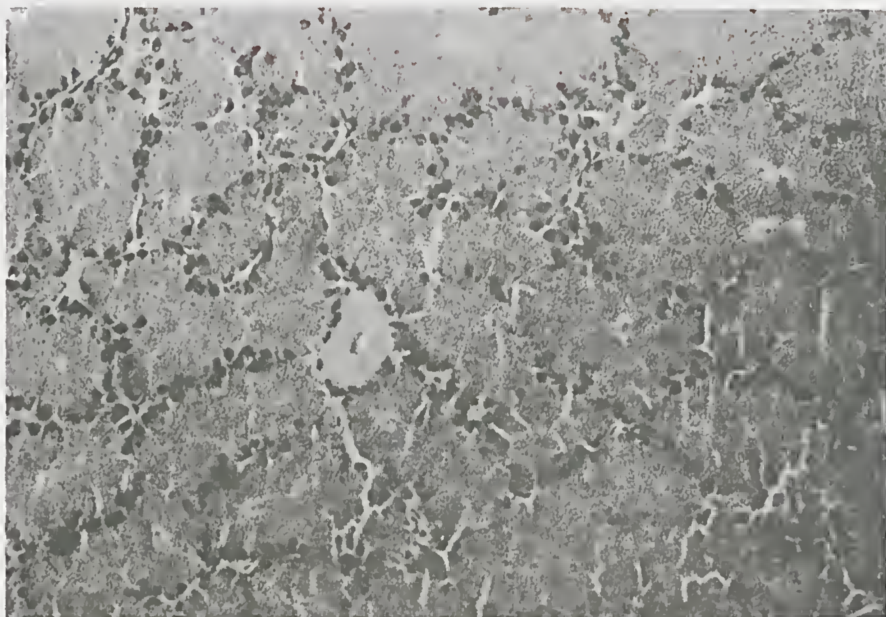


Fig. 3 — Glândula de Harder de *Eunectes murinus* mostrando ácinos constituídos de células com citoplasma rico em grânulos acidófilos, após coloração pelo HE (400 X).

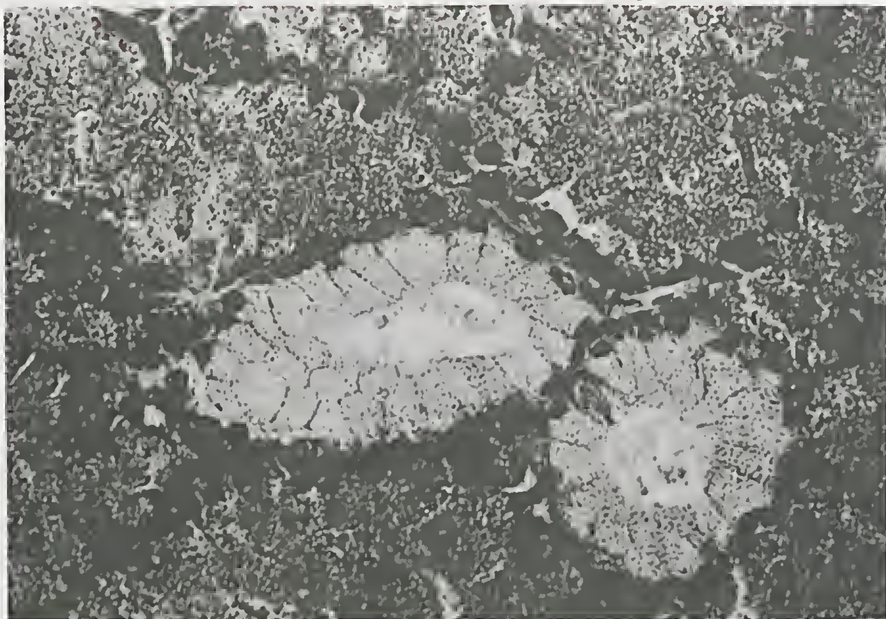


Fig. 4 — Glândula de Harder de *Eunectes murinus* mostrando ácinos com células repletas de grânulos acidófilos e ductos mais claros de aspecto basófilo, após coloração pelo HE (940 X).

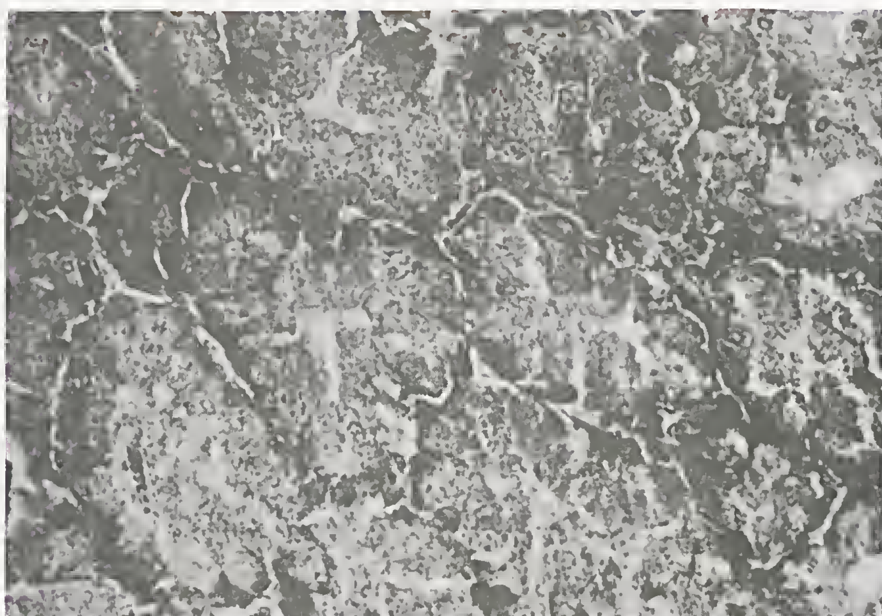


Fig. 5 — Glândula de Harder de *Micrurus corallinus* mostrando ácinos com células contendo grânulos acidófilos, após coloração pelo HE (940 X).

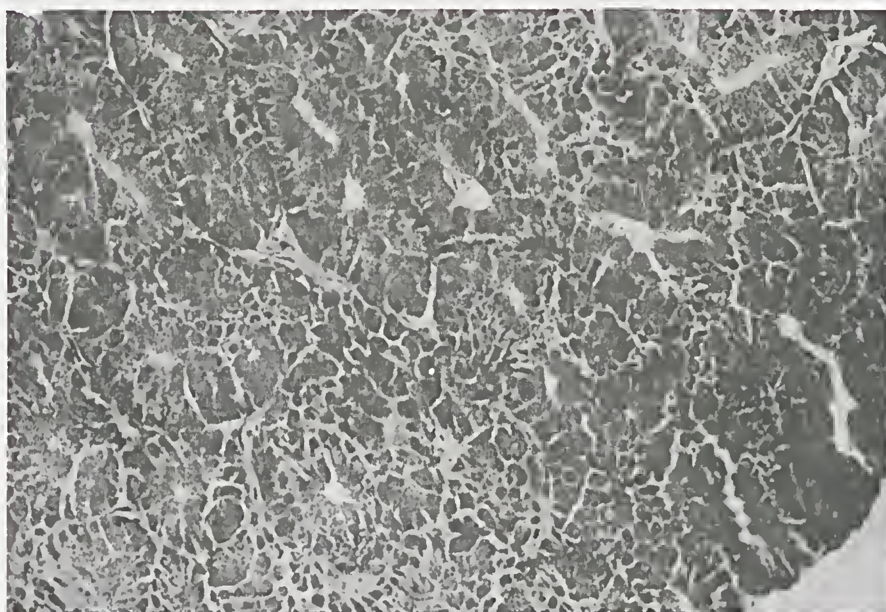
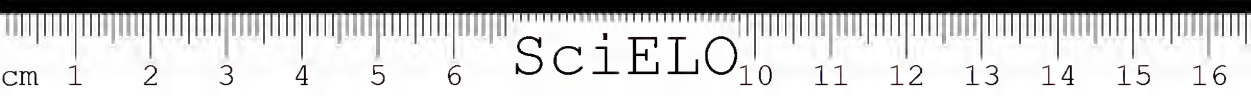


Fig. 6 — Glândula de Harder de *Bothrops jararaca* mostrando ácinos constituídos de células altas com citoplasma repleto de grânulos acidófilos, após coloração pelo HE (500 X).


cm 1 2 3 4 5 6
SciELO
10 11 12 13 14 15 16

Mem. Inst. Butantan
38: 51-62, 1974

# ULTRASTRUCTURE OF MATURE ERYTHROCYTES FROM FIVE BOTHROPIC SPECIES*

H. MENEZES, C. Y. MITSUTANI, J. R. R. COIRO, M. A. S. CARVALHO DOS SANTOS, and A. BRUNNER JR.

Laboratory of Electron Microscopy — Instituto Butantan

*SUMMARY* — Mature erythrocytes of five bothropic species were studied at the ultrastructural level. Vesicles of mitochondrial origin, carrying nuclear material, and smooth endoplasmic reticulum distributed through the cytoplasm or confined to a restricted region, as well as Golgi complexes containing electron-dense material, were found; while the Golgi complex of *B. jararaca* erythrocytes is highly developed, that of other species erythrocytes rather small. All results of acid phosphatase reaction for cytolysome identification were negative.

*UNITERM* — Erythrocyte ultrastructure in Bothrops.

## INTRODUCTION

There are only a few specific reports on the ultrastructure of mature and immature avian and amphibian erythrocytes. No studies regarding this matter have been done on reptiles. BEAMS and ANDERSON (1) reported investigations on a supposed "segregation apparatus" in *Necturus maculosus* erythrocytes. DAVIES (2) described some aspects of mature erythrocytes in *Gallus domesticus* and *Rana pipiens* giving emphasis to the hemoglobin penetration into and protusions rising from the nucleus. In amphibians TOOZE and DAVIES (3) obtained positive results for acid phosphatase reaction in morphologically characteristic lysosomal bodies and autophagic vacuoles of erythrocytes. VANKIN et al. (4) compared in *Rana catesbeiana* the ultrastructure of mature tadpole red blood cells with the adult hemoglobin synthesizing microcytic cells (5), the latter presenting the common ultrastructural characteristics of immature mammalian erythrocytes.

Even at optical level, little is known on the reptile erythrocyte cytology. Cytoplasmic granules, mitochondria, as well as Golgi complex were described already in erythrocytes of birds, tortoise and some snake species (6, 7, 8). This paper reports ultrastructural aspects of mature erythrocytes from five bothropic species, mainly on the formation of vesicles of mitochondrial origin, carrying nuclear material, the presence of more or less developed Golgi complexes, and other structures.

## MATERIAL AND METHODS

Five adult bothropic species (*B. jararaca, B. jararacussu, B. pradoi, B. alternatus, B. neuwiedi*), apparently without any traumatism, used in

* This research has been supported by the Conselho Nacional de Pesquisas (Proc. 10112/71) and Fundo Especial de Despesas do Instituto Butantan.

Adress: C.P. 65 — 05504 — São Paulo — Brazil





this study, were kindly supplied by the Serviço de Animais Peçonhentos — Instituto Butantan. Blood samples, obtained by cutting off the tail, were harvested into a 2% EDTA solution adjusted to pH 7.3-7.4 by the addition of a 4% $NaHCO_3$ solution.

*ROSENFELD staining:* Staining according to ROSENFELD (9) was done routinately for the detection of hemoparasites commonly found in this material, as well as for the evaluation of the several hematological aspects of the samples.

*Supra-vital staining:* To evaluate the percentage of immature erythrocytes (cells presenting a basophilic reticulum) one drop of blood was added to 10 drops of a 0.75% NaC1 solution, containing 0.1% brilliant cresyl blue, followed by the examination through immersion microscopy.

*FEULGEN reaction*: Blood smears were submitted to the FEULGEN reaction according to LISON (10), in order to detect DNA within the erythrocyte vesicles. Smears pretreated by phosphate buffer containing DNase, as well as by plain buffer were used as controls.

*Electron-microscopy:* Thin blood smears were hemolysed in a 0.80% NaC1 solution containing 2.5% v/v concentrated formalin (11), or a 2.5% v/v aqueous 25% glutaraldehyde solution (12), followed by phosphotungstic acid staining, and several washings in distilled water (11). Some smears were then submitted to the shadow casting process with palladium.

For thin sectioning, the fixation of untreated blood was done as follows: a) direct fixation in 0.23M Millonig's buffer containing 1% glutaraldehyde for 1-2 h. b) To 15 drops of blood, 15 drops of 2% glutaraldehyde in 0.23M Millonig's were added drop by drop, each followed by slow agitation. After 30 min, the suspension was diluted with 2-3 volumes of buffer containing 1% glutaraldehyde and fixed for 2 h (12). After both fixation procedures, the erythrocytes were extensively washed for three times in the buffer, and fixed for 20 min in 1% osmium tetroxide in the same buffer.

Acid phosphatase reaction was done according to KENT et al. (13); the red blood cells were then fixed in 1% osmium tetroxide in cacodylate buffer. Ribonuclease digestion was done in 0.14M acetate buffer (pH 6.8) containing 0.10% RNase (General Biochemical Inc.); the material was incubated for 1 h at 37°C. (RNase solution was previously heasted at 80°C for 15 min, to eliminate a possible contamination by DNase). As controls, erythrocytes were incubated without RNase under the same conditions. Fixation was done in 1% osmium tetroxide in 0.14M veronal-acetate buffer (pH 7.4).

Erythrocytes, submitted to acid phosphatase reaction, RNase digestion, or no treatment at all were stained, after fixation, in an 1% aqueous uranyl acetate solution (60 min), dehydrated in the alcohol series, and embedded in Polylite 8001-P (14). Thin sections were obtained in Porter-Blum MT-1 and MT-2 microtomes, stained by lead citrate (15), and examined in the ÜM 100b and Elmiskop I electron microscopes, at 60 Kv.





## RESULTS

Through the ROSENFELD staining technique, besides of endoerythrocytic parasites, basophilic, polychromatofilic and orthochromatic erythrocytes were found in the smears.

Erythrocytes supravitally stained by brilliant cresyl blue show variable amounts of a basophilic reticulum or "Substantia granulo-filamentosa". Blood of intensely parasitized specimens presents immature erythrocytes in a proportion of about 40%, e.g. in *Bothrops jararaca.* Mature cells, void of basophilic reticulum, contain one to six cytoplasmic basophilic corpuscles. Smears submitted to the FEULGEN reaction, contain erythrocytes presenting one to three spherical corpuscles per cell positively evidenced by the reaction. The percentage of cells with "Substantia granulo-filamentosa" is approximately the same as that of cells without positive FEULGEN reaction in the cytoplasm.

Hemolysed smears show elliptical ghosts of mature erythrocytes, generally presenting a relatively wide peripheral fold (Fig. 1). From the central ellyptical nucleus, rods or short filaments, measuring 0.31 $\mu$ in diameter, seem to protrude to the cytoplasm; juxtaposed or distant from the nucleus, corpuscles of 0.55 to 0.85 $\mu$ in diameter were also found.

As ascertained through thin sections, mature erythrocytes may present remnants of the marginal band (Fig. 2). The red blood cells of all bothropic species here studied present commonly, two or three mitochondria near the nucleus or juxtaposed to the nuclear membrane; in all instances their disposition occurs in regions, less or more distant from the nuclear membrane pores, where chromatinic material is localized. Figure 3 (*B. pradoi*) show penetration of dense chromatinic masses into the mitochondria. In these cases the masses are more electron-dense than the nuclear material, and at this stage of the phenomenon mitochondria show only traces of their inner structure. In *B. alternatus* samples, condensation of still intranuclear chromatin occurs, as seen in the erythrocyte of Fig. 4.

The erythrocyte of Fig. 5 presents a nucleus containing condensed chromatin, and a less electron-dense formation corresponding to the nucleolus, centrally disposed, magnified in Fig. 6. It is predominantly constituted by finely granulated material, and by higher electron-dense and larger granules at a region of its periphery. The effect of ribonuclease digestion can be observed in Fig. 7. The cytoplasm presents only simple diffusely distributed ribosomes; besides mitochondria and smooth endoplasmic reticulum, two vesicles distant from the nucleus, with dense lamellated and partially amorphous material, are observed. Erythrocytes of all species present a smooth endoplasmic reticulum distributed throughout the cytoplasm, but several red blood cells show a reticulum confined to a restricted region (Fig. 8). Highly developed Golgi complexes were frequently found in mature *B. jararaca* erythrocytes, as in Fig. 9; the dictyosome is constituted by numerous narrow and arched saccules surrounded by smaller and larger vesicles of low electron-density. Figure 10 shows two large vesicles,

one of them containing an amorphous and partially lamellated dense material, near to the Golgi complex; in other instances, these large vesicles contain finely granulated or vesiculated material as in Fig. 11. The dictyosome of this erythrocyte is electron-dense.

Erythrocytes of *B. pradoi* present a rather less developed Golgi complex as shown in Fig. 12. A large vesicle, whose remarkable dense content contacts the dense dictyosome of this complex, is evident. Some Golgi complexes are constituted by a dictyosome which contain an accentuated dense material (Fig. 13). In this figure a smooth endoplasmic reticulum seems to be continuous between the dictyosome and the obliquely sectioned plasmic membrane. In various assays, reactions for acid phosphatase detection in *B. jararaca* erythrocytes, were never positive as compared to the positiveness of the controls.

The general aspect above described for mature erythrocytes of *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. pradoi* and *B. alternatus*, are depicted in Fig. 14. Compact chromatin distribute itself more at the whole periphery of the nucleus, except at the nuclear membrane pores; through the pore, hemoglobinized cytoplasm enter the karyoplasm, enhancing their electron density. However, in *B. neuwiedi* (Fig. 15) the chromatin of mature erythrocytes is not compact and is distributed through practically the whole karyoplasm. The cytoplasmic aspects are the same as those described for the erythrocytes of other species.

## DISCUSSION

All bothropic specimens examined presented immature erythrocytes in the peripheral blood, identified through the ROSENFELD staining, as well as the brilliant cresyl blue supravital staining. This finding denotes anemia, probably of hemolytical nature, ascribable to parasitism.

Mature erythrocytes show at least one, usually two or three dense corpuscles of about 0.70 μ in diameter, rods, and short filaments, besides the elements of the marginal band or their remnants, which in hemolyzed smears of erythrocytes may be taken for wide folds of the cell membrane (Fig. 1). According to FAWCETT and WITEBSKY (16), the marginal band found in avian (12), amphibian (17), and also, as expected, in reptile erythrocytes (Fig. 2) could be responsible for the cell shape. Comparing hemolyzed with sectioned erythrocytes, a correspondence between mitochondria, and rods and short filaments, can be ascertained based on the evidence obtained in the course of studies on mammalian immature erythrocytes (18,19). Several corpuscles observed in hemolyzed erythrocytes (Fig. 1) are the FEULGEN positive vesicles, never found in immature erythrocytes. Their mitochondrial origin (Figs. 3 and 4) has been also stated in mature chick (12), frog (17), and fish (20) erythrocytes; in experimental induced anemia, mature frog erythrocytes showed besides a defined FEULGEN reaction, labelled vesicles through $^{3}$H-thymidine incorporation. (21). A correlation can be considered between this phenomenon, i.e. the expulsion of chromatinic material





fragments from mature erythrocyte nuclei, and the extrusion of nuclei in mammalian orthochromatic erythroblasts, as already suggested during the course of studies on mature chick (12), frog (17) and fish (20) erythrocytes. Those erythrocytes are considered mature, which do not present any polysomes, but still may contain simple ribosomes, because globin synthesis had already ceased.

In mature *B. jararaca, B. jararacussu, B. pradoi* and *B. alternatus* erythrocytes (Fig. 5) were found the same general aspects as in amphibian and fish red blood cells, except that in several instances the smooth endoplasmic reticulum seems to be concentrated in certain regions of the erythrocytes (Fig. 8). This aspect might suggest the formation or disorganization of a Golgi complex. In one way or other there is still no evidence to support either interpretation.

Compared with erythrocytes of other bothropic species, as *B. pradoi* (Fig. 12), the Golgi complex of *B. jararaca* is markedly more developed, suggesting a higher activity in the latter (Fig. 9); the nature of this activity is still unknown, but it seems not to be correlated with the cytolysomes, since the results for acid phosphatase reaction, obtained according to KENT et al. (13), were negative; however, this fact does not excluded a possible existence of cytolysomes without acid phosphatase. TOOZE and DAVIES (3), in performing this reaction in amphibian erythrocytes, found positiveness at the optical microscope. However, an extrapolation fro mthe optical to the ultrastructural level is difficult, considering that at the latter several types of vesicles can be found Figs. 9, 10, 11). The dictyosome of trythrocytes of all species examined, generally, shows a dense material (Figs. 11, 13), possibly correlated with the dense material observed within the vesicle closely connected to the dictyosome, as shown in Fig. 12. Such dense material was also found within a dictyosome of mature carp erythrocytes (20).

An accentuated difference was stated between the nuclei of the mature erythrocytes of *B. neuwiedi* (Fig. 15), and those of other four species (Figs. 5, 14). The former show the chromatinic material distributed through the karyoplasm, whereas the chromatin of mature *B. jararaca, B. jararacussu, B. pradoi* and *B. alternatus* is predominantly dispersed at the nuclear periphery. Their nuclei contain a less electron-dense, fine, and roughly granulated material (Fig. 5, 6, 14), which can be identified as a nucleolus since a marked effect was obtained through ribonuclease digestion (Fig. 7).

*RESUMO* — Eritrócitos maturos de 5 espécies botrópicas foram estudados ao nível ultraestrutural. Vesículas de origem mitocondrial, contendo material nuclear foram constatadas. O retículo endoplasmático liso pode estar distribuído pelo citoplasma ou confinado a uma região restrita. Complexos de Golgi, contendo material eletrodenso, são freqüentemente observados. Enquanto o complexo de Golgi de eritrócitos de *B. jararaca* é altamente desenvolvido, aqueles de outras espécies apresentam-se com dimensões comumente observadas. Os resultados para detecção de fosfatase ácida em citolissomos foram negativos.

*UNITERMO* — Ultraestrutura de eritrócitos de *Bothrops*.

*Acknowledgements.*

The authors wishes to thanks Mrs. Vera Mondin Weisz for her excellent technical assistence, and Mrs. Sibylle Heller for her editorial aid and translation.

FIGURE LEGENDS

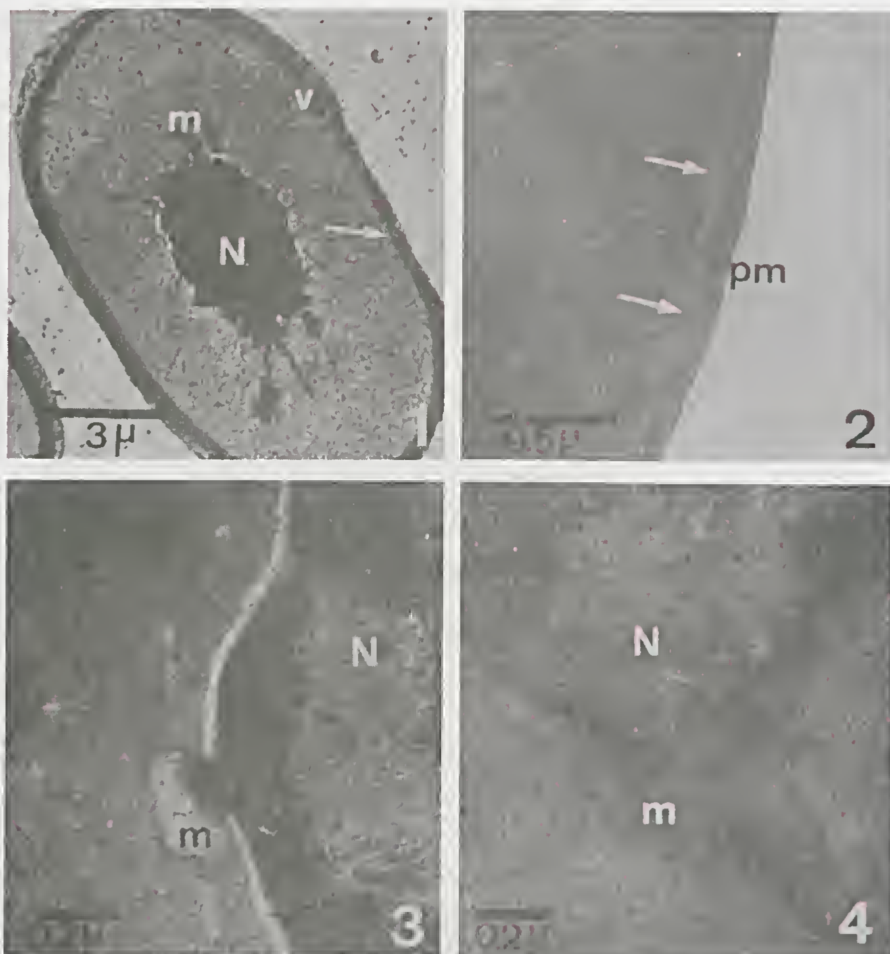
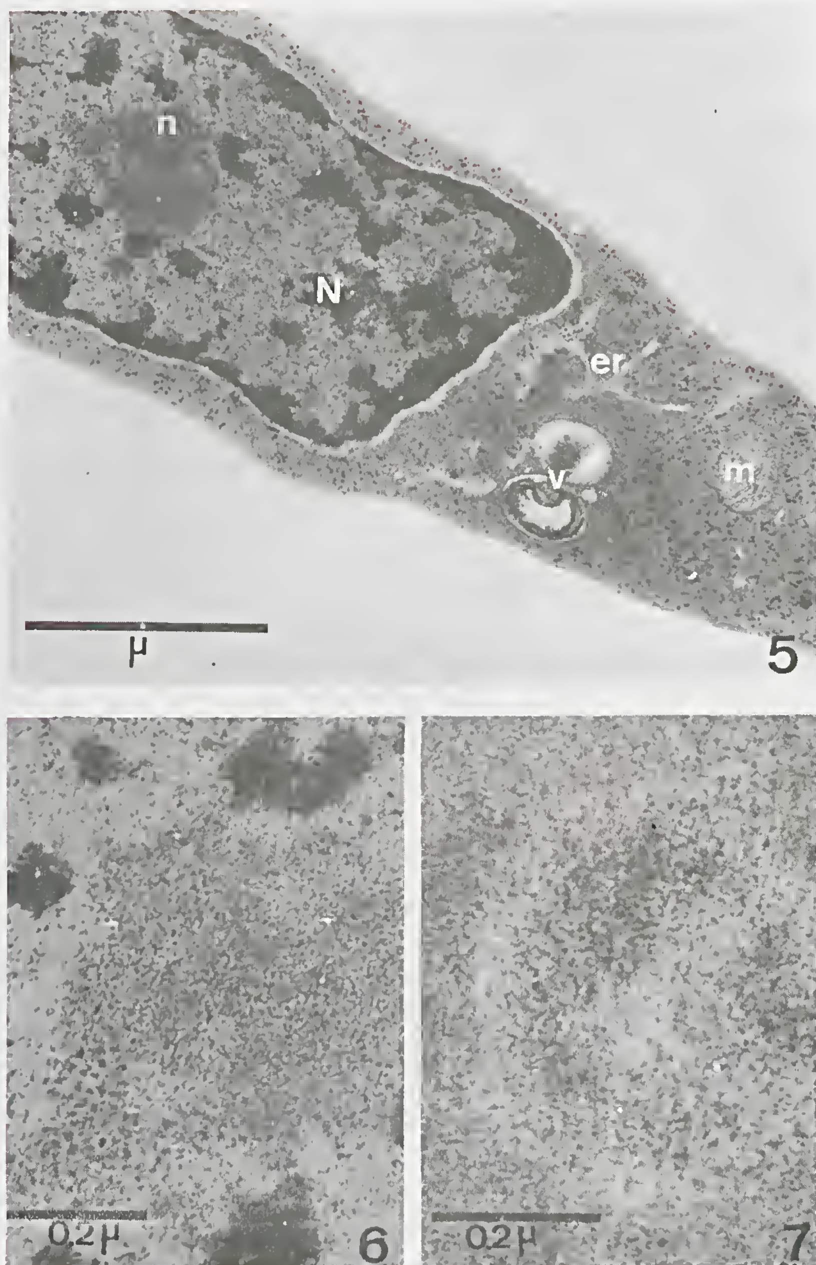



**Fig. 1** — Mature *B. jararaca* erythrocyte from a hemolized smear. *N.* — nucleus; *m* — mitochondria; *v* — probable vesicle; *arrow* — wide membrane fold.

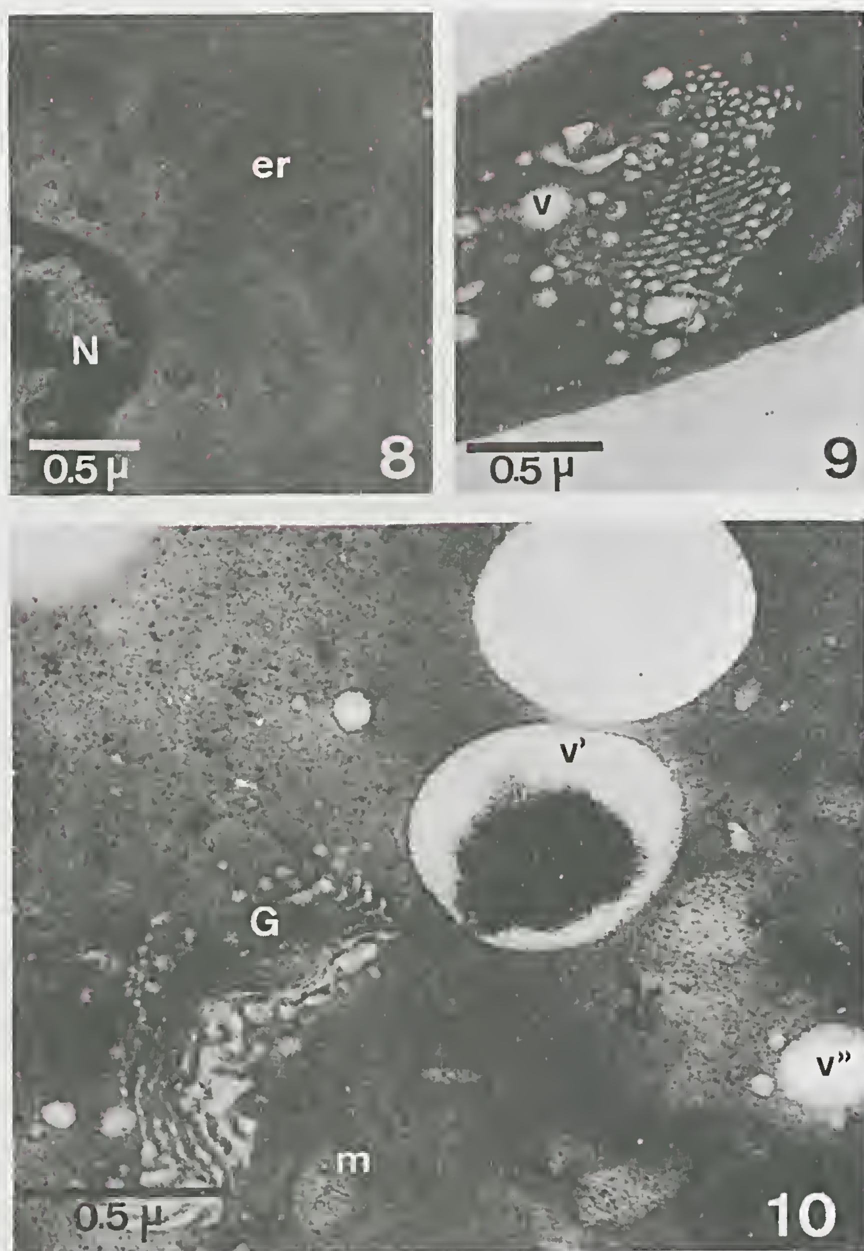
**Fig. 2** — Thin sections of mature *Bothrops erythrocytes*. *B. jararacussu* erythrocyte presenting traces of microtubules (arrows) of the marginal band; *pm* — *plasmic membrane*. Figs. 3 and 4 — *B.* pradoi and *B. alternatus* erytrocytes respectively; *N.* — nuclei; *m* — mitochondria receiving condensed chromatinic material. In the latter case chromatinic condensation has already occured in the nucleus.

MENEZES, H., MITSUTANI, C. Y., COIRO, J. R. R., CARVALHO DOS SANTOS, M. A. S. & BRUNNER JR., A. — Ultrastructure of mature erythrocytes from five bothropic species. *Mem. Inst. Butantan, 38*: 51-62, 1974.

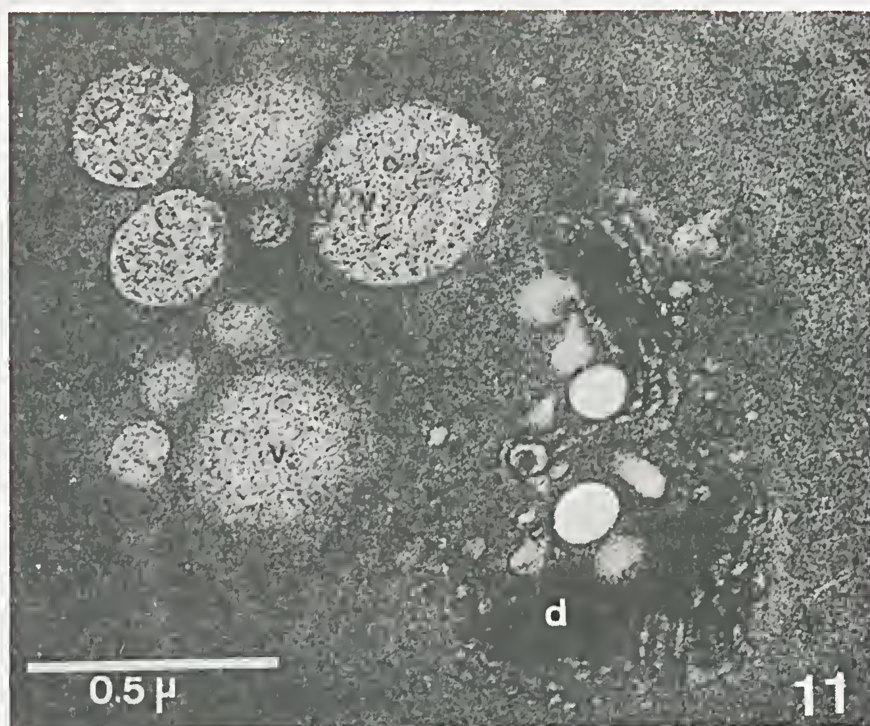



Thin sections of mature *B. jararaca* erythrocytes. Fig. 5 — Nucleus *N*. containing a nucleolus *n*; *m* — mitochondrion; *v* — vesicles; *er* — endoplasmic reticulum. The cytoplasm presents simple ribosomes. Fig. 6 — Magnification of the nucleolus *n* of Fig. 5 showing fine and roughly granulated material. Fig. 7 — Effect of ribonuclease treatment on a nucleolus.

MENEZES, H., MITSUTANI, C. Y., COIRO, J. R. R., CARVALHO DOS SANTOS, M. A. S. & BRUNNER JR., A. — Ultrastructure of mature erythrocytes from five bothropic species. *Mem. Inst. Butantan, 38*: 51-62, 1974.




Thin sections of mature *Bothrops* erythrocytes. *Fig. 8* — *B. pradoi* erythrocyte presenting a smooth endoplasmic retriculum *er* confined to a limited region. *N.* — nucleus *Fig. 9* — *B. jararaca* erythrocyte containing a remarkable developed Golgi complex; *d* — dictyosome, *v* — vesicles. *Fig. 10* — *B. jararaca* erythrocyte. *G.* — Golgi complex; *v* — vesicle containing a dense amorphous and partially lamellated material; *v'* — vesicle without dense material; v" — large vesicle surrounded by smaller ones; *m* — mitochondrion.

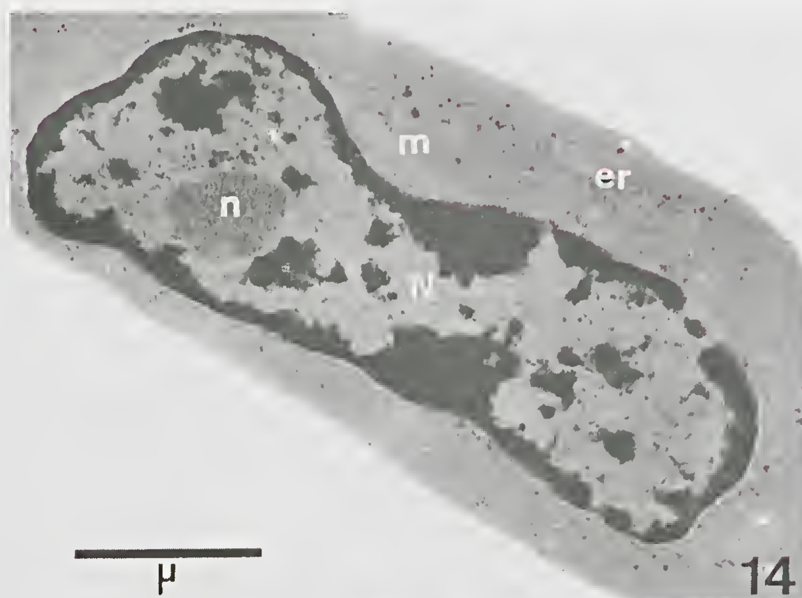


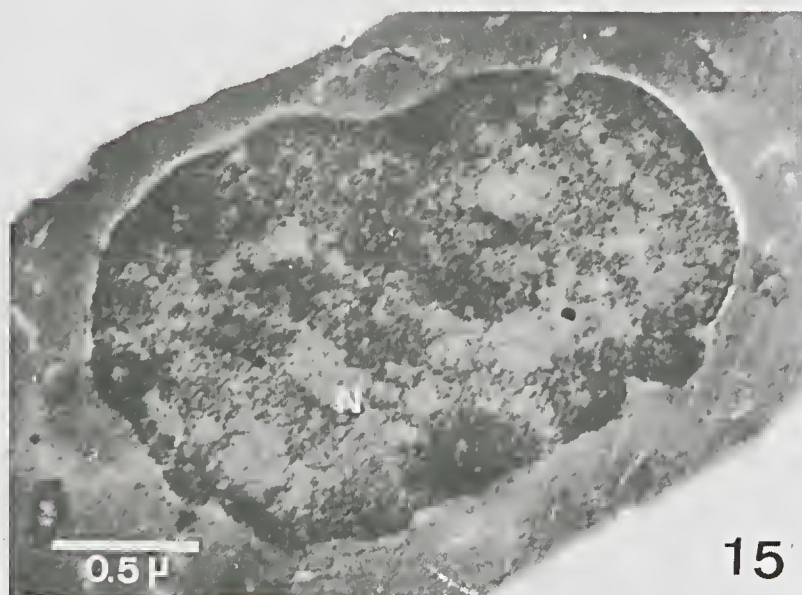







Thin sections of mature *Bothrops* erythrocytes. *Fig. 11* — *B. jararacussu* erythrocyte whose Golgi complex present a dictyosome *d* containing dense material. Nine vesicles *v*, sectioned at different levels, carrying granulated and membranous material, are seen. *Fig. 12* — *B. pradoi* erythrocyte. *N.* nucleus; *G* Dense Golgi complex closely connected to a vesicle *v* containing dense material. *Fig. 13* — *B. neuwiedi* erythrocyte. The Golgi complex *G* presents a highly dense material, and is continuous to a smooth endoplasmic reticulum *er*, which, in its turn, is continuous to the plasmic membrane.




Thin sections of mature *Bathrops* erythrocytes. *Fig. 14* — *B. jararaca* erythrocyte showing a nucleus *N* containing dense chromatin distributed mostly at their periphery, and a less electron-dense nucleolus *n*. In the cytoplasm two mitochondria *m* and a smooth endoplasmic reticulum *er* are seen. *Fig. 15* — *B. neuwiedi* erythrocyte whose nucleous *N* presents a loose and consequently less derse chromatin distributed throught the karyoplasm. The aspect of cytoplasm is the same as that of other botropic species erythrocytes.

MENEZES, H., MITSUTANI, C. Y., COIRO, J. R. R., CARVALHO DOS SANTOS, M. A. & BRUNNER JR., A. — Ultrastructure of mature erythrocytes from five bothropic species. *Mem. Inst. Butantan, 38*: 51-62, 1974.

---

REFERENCES

1. BEAMS, H. W. and ANDERSON, E. - Fine structure of the so called segregation apparatus in erythrocytes of *Necturus*. Exper. Cell Res., *20*: 604-687, 1960.

2. DAVIES, H. G. — Structure in nucleated erythrocytes. J. Biophysic. and Biochem. Cytol., *9*: 671-687, 1961.

3. TOOZE, J. and DAVIES, H. G. — Cytolysomes in amphibian erythrocytes. J. Cell Biol., *21*: 146-150, 1965.

4. VANKIN, G. L., BRANDT, E. M. and DE WITT, W. — Ultrastructural studies of red blood cells from thyroxin-treat *Rana catesbeiana* tadpoles. J. Cell Biol., *47*: 767-772, 1970.

5. MOSS, B. and IGRAM, V. M. — The repression and induction by thyroxin of hemoglobin synthesis during amphibian metamorphosis. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., *54*: 967-974, 1965.

6. BHATTACHARYA, D. R. and ROGERS BRAMBELL, F. W. — The Golgi body in the crythrocytes of the Sauropsida. Quart. Journ. Micr. Sci., *69*: 357-359, 1925.

7. HIRSCHLER, J. — Studien über die Plasmakomponenten (Golgi Apparatus) an vital gefarbten mannlichen Geschlechtszellen einiger Tierarten. Z. Zellforsch., *7*: 62-82, 1928.

8. RYERSON, D. L. — A preliminary survey of reptilian blood. J. Ent. Zoll. *41*: 49, 1949.

9. ROSENFELD, G. — Corante pancromico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grunwald e do Giemsa em um só corante de emprego rápido. Mem. Inst. Butantan, *20*: 329-334, 1947.

10. LISON, L. — Histochimie e Cytochimie Animales. Principes et methodes. Vol. 1 Gauthier-Villars, pg. 475-480, 1953.

11. BRUNNER JR., A. and VALLEJO-FREIRE, A. — Electron microscopic observations on granules filaments (Reticulosomes) of reticulocytes. Exp. Cell Res., *10*: 55-62, 1956.

12. COIRO, J. R. R. — Estudo comparativo da ultra-estrutura de elementos da série eritrocitária de aves e mamíferos. Correlação com a biossíntese de hemoglobina. Doctorate Thesis — Univer. São Paulo, 1974.

13. KENT, G., MINICK, O. T., VOLINI, F. L. and ORFEI, E. — Autophagic vacuoles in human red cells. Amer. J. of Pathol., *48*: 831-858, 1966.

14. COIRO, J. R. R. and BRUNNER JR., A. — Behaviour of Polylite 8001 with plasticizing additives. In: III Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, Rio de Janeiro, 1973.

15. REYNOLDS, E. S. — The use of lead citrate of high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol., *17*: 209, 1963.

16. FAWCETT, D. W. and WITEBSKY, F. — Observations on the ultrastructure of nucleated erythrocytes and thrombocytes, with particular reference to the structural basis of their discoidal shape. Z. Zellforsch., *62*: 782-806, 1964.

17. CARVALHO DOS SANTOS, M. A. S. — Unpublished observations, 1973.

18. BRUNNER JR., A., VALLEJO-FREIRE, A. and SOUZA SANTOS, P. — Electron microscopy of thin sections of reticulocytes. Experientia, *12*: 255, 1965.

19. VALLEJO-FREIRE, A. and BRUNNER JR., A. — Eritrócitos na Reticulocitose do saturnismo experimental. Mem. Inst. Butantan, *28*: 245-266, 1957/58.

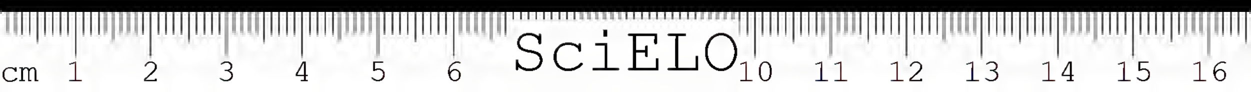
20. BRUNNER JR., A., MENEZES, H., COIRO, J. R. R., MITSUTANI, C. Y. and CARVALHO DOS SANTOS, M. A. S. — Vesicles carrying nuclear material in mature *Cyprinus carpio* erythrocytes. (Submitted to appreciation, 1974).

21. MENEZES, H., MITSUTANI, C. Y., and BRUNNER JR., A. — Preliminary results, 1974.

Recebido para publicação em 30-V-1974 e aceito em 15-IX-1974.






cm 1 2 3 4 5 6
SciELO
10 11 12 13 14 15 16

Mem. Inst. Butantan
38: 63-68, 1974

# PRESENÇA DE *CYSTICERCUS PISIFORMIS* (BLOCH 1780) EM COELHO E LEBRE IMPORTADOS

BRUNO SOERENSEN *
LUIZ ZEZZA NETO **
MARIO DEMAR PEREZ ***
GILDA MEIRE BULKA ****
ANTONIA ELENICE GIMENES ONO ****

*RESUMO* — É relatada a ocorrência de *Cysticercus pisiformis* em dois leporinos importados da França.

Os autores alertam as autoridades sanitárias no sentido de que a *Taenia pisiformis* não venha a se disseminar no Brasil.

*UNITERMOS* — *Taenia pisiformis*. — *Taenia serrata*. — *Cysticercus pisiformis*. — *Cysticercus pisiformis* em coelho e lebre.

## INTRODUÇÃO

A *Taenia pisiformis*, segundo literatura consultada, foi assinalada no Brasil, conforme lista helmintológica de Freitas (3). A raridade de seu encontro justifica o presente relato.

Na fase adulta esse cestóide tem por *habitat* o intestino do cão, do gato e de carnívoros silvestres; sua larva o *Cysticercus pisiformis*, se desenvolve no fígado, epiploon e mesentério da lebre e do coelho.

O adulto mede de 0,5 cm a 2 m de comprimento, apresentando escólex pequeno dotado de coroa de ganchos; o estróbilo, dentado, possue proglotes quadrados na parte média da cadeia e retangulares na porção distal.

Os ovos são ovais com 36 a 40 x 31 a 36 micra.

O hospedeiro definitivo se infesta ingerindo vísceras contendo o cisticerco (1, 2, 4, 5, 7, 8, 9) sendo que dois meses após a infestação começa a eliminar anéis maduros; a lebre e o coelho se infestam ingerindo alimentos contaminados com fezes do cão (1).

No estômago do hospedeiro intermediário o embrião hexacanto se liberta e por via hemática atinge o fígado, o epiploon e o mesentério. Os embriões retidos no fígado determinan lesões caracterizadas por fibrose, sendo que após 15 dias da infestação já se observa densa infiltração

* Professor da Disciplina de Laboratório Clínico Veterinário da Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu e Diretor da Divisão de Microbiologia e Imunologia do Instituto Butantan.
** Professor Titular da Disciplina de Patologia Especial Animal da Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu.
*** Professor Adjunto do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.
**** Médicos Veterinários.

Endereço para correspondência:
C.P. 65 — 05504 — S. Paulo — Brasil.

de leucócitos e linfócitos, chamando atenção a presença de eosinófilos; posteriormente essas larvas se calcificam não sendo observadas células gigantes.

As secções do epiploon e do mesentério, nas quais são encontrados cisticercos, apresentam tecido hipertrofiado e intenso infiltrado celular.

A parasitose na lebre e no coelho é carente de sintomas, notando-se apenas aumento de volume do abdômen, sendo o diagnóstico feito pelo encontro do parasito nas necroscopias (8).

## MATERIAL E MÉTODOS

Recebemos para necroscopia no mês de fevereiro de 1972 uma lebre — *Lepus europeus* — e um coelho — *Oryctolagus cuniculus* — importados da França há aproximadamente 15 dias.

As necroscópias foram realizadas obedecendo a técnica de Zencker Borst, adaptada para a Medicina Veterinária por Martins (6).

Após a identificação dos cisticercos, fragmentos de diversos órgãos foram fixados em formol a 10%; os cortes histológicos posteriormente obtidos foram corados pelo método da Hematoxilina Eosina.

## RESULTADOS

O exame necroscópico dos animais revelou o abdômen quase todo preenchido por formações císticas em forma de cacho de uva aderidas ao epiploon (fig. 1 e 2) que foram identificadas como *Cysticercus pisiformis;* essas larvas císticas medem, em média, 0,5 cm de maior diâmetro, são moles, de cor branco- amarelada, contendo escólex invaginado (fig. 3 e 4) e líquido fluido, límpido e transparente.

O exame macroscópico das demais vísceras nada revelou que fosse digno de nota.

O exame microscópico do fígado mostrou no seio da massa hepática área bastante circunscrita por tecido conjuntivo denso, contendo restos do parasito, focos de calcificação, alguns eosinófilos e raros neutrófilos. (fig. 5).

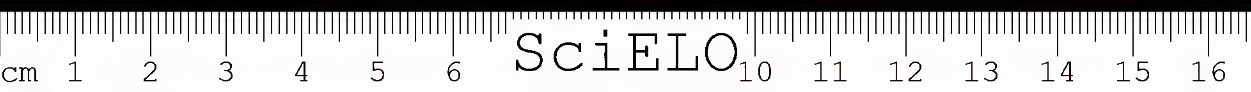
Ao exame microscópico o epiploon revelou-se bastante espessado e com grande infiltrado eosinofílico; entre o tecido conjuntivo e a massa eosinifílica verificam-se cortes do parasito em diferentes sentidos. São vistos alguns neutrófilos e linfócitos além de vasos bastante dilatados, cheios de sangue, e discreto foco de calcificação, (fig. 6).

## CONCLUSÃO

Pelo exposto, recomenda-se, às autoridades sanitárias e criadores, estarem alertas para que tal parasitose não seja disseminada em nosso meio.

Recomenda-se ainda que as importações somente possam ser efetuadas por criadores que comprovadamente possuam condições de higiene que impossibilitem a progressão do ciclo do parasito.





SOERENSEN, B., ZEZZA NETO, L., PEREZ, M. D., BULKA, G. M. & ONO, A. E. G. — Presença de *Cysticercus pisiformes* (Bloch 1780) em coelho e lebre importados.

*Mem. Inst. Butantan, 38*: 63-68, 1974.

*SUMMARY* — The ocurrence of *Cysticercus pisiformis* in two leporines imported from France is described.

The authors call the attention of the sanitary authorities to avoid that *Taenia pisiformis* might disseminate itself in Brazil.

*UNITERMS* — *Taenia pisiformis.* — *Taenia serrata.* — *Cysticercus pisiformis.* — *Cysticercus pisiformis* in rabbits and hares.

## BIBLIOGRAFIA

1 — DALLING T. — Ufaw handbook the care and management of laboratory animals. — Bailliére, Tindall and Cox — London 1949.

2 — EVANS, W. M. R. — Observation upon some common cestode parasites of the rabbit. *Oryctolagus cuniculus.* — *Parasitology, 32*(1):78-90, 1940.

3 — FREITAS, M. G. — Lista de helmintos parasitos dos animais domesticos de Minas Gerais. — *Arq. Esc. Sup. Vet.* Belo Horizonte, *10*:373-381, 1957.

4 — GELORMINI, N. — Enfermedades parasitarias en veterinaria. — Libreria "El Ateneo" Editorial — Buenos Aires — 1967.

5 — HUTYRA, F. V.; MAREK, J. Y.; MANNINGER, R. — Patologia y Terapeutica Especiales de los Animales Domésticos. — Tomo segundo. Octava edicion refundida y aumentada. Editorial Labor, S. A. — Barcelona — 1953.

6 — MARTINS, O. E. — Técnica de necroscopia para os animais domésticos — Comunicação Pessoal.

7 — MILLER, H. M. and KERR, K. B. — Attempts to immunize rabbits against a larval cestode, *Cysticercus psisiformis.* — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 29*:670-671, 1932.

8 — SABATIER, H. — Le lapin et son élevage professionnel. — Dunod — Paris — 1971

9 — SOLOMON, S. G. — Some points in the early development of *Cystercus pisiformis.* — *J. Helminth,* 12:197-204, 1934.

Recebido para publicação em 15-III-1974 e aceito para publicação em 10-X-1974.





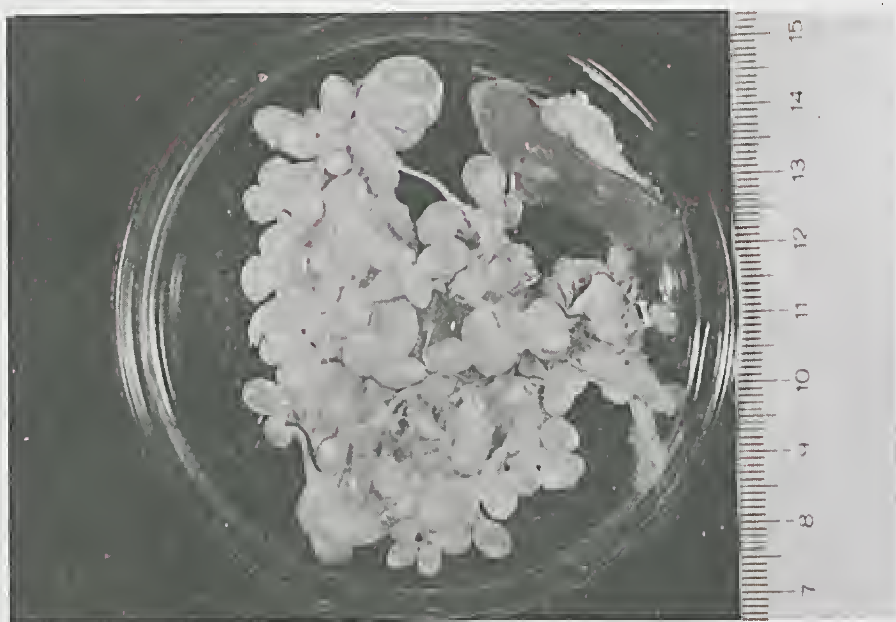


Fig. 1 — *Cysticercus pisiformis* — Formações císticas, que tomam todo o epiploon.

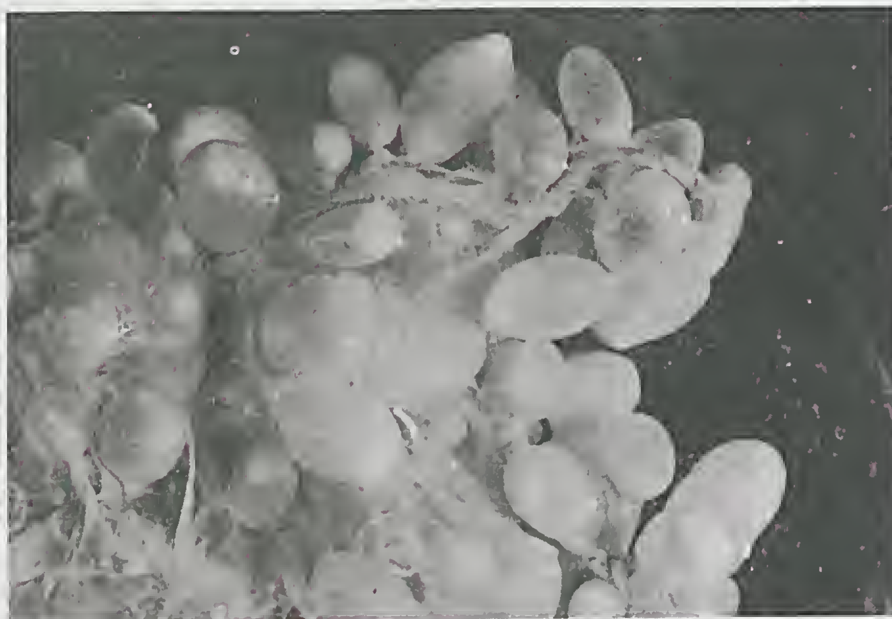


Fig. 2 — *Cysticercus pisiformis* — Formação típica em cacho de uva, notando-se bem a transparência dos cistos.



Fig. 3 — *Cysticercus pisiformis* — Escolex (X 80).

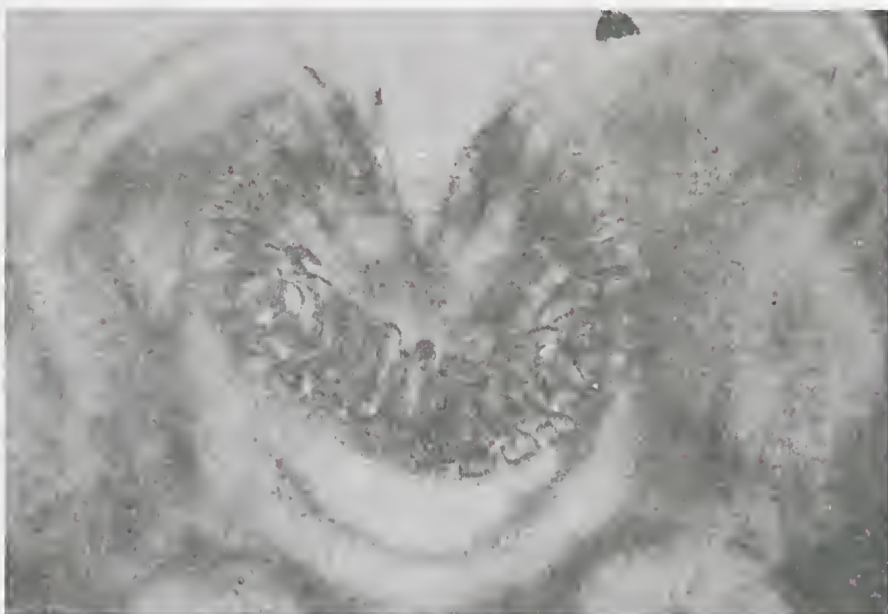


Fig. 4 — *Cysticercus pisiformis* — Escolex. Detalhe mostrando a forma e a disposição dos áculeos (X 160).

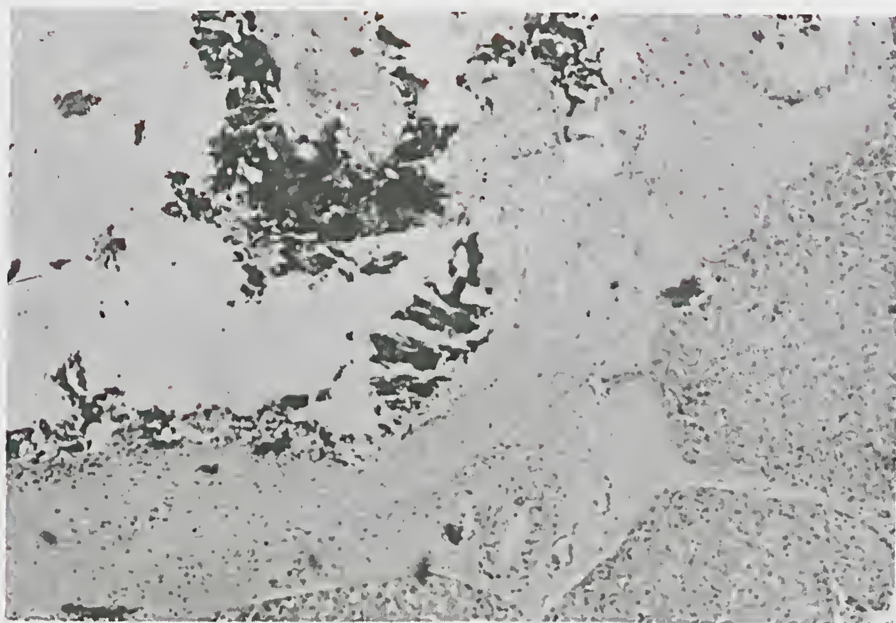


Fig. 5 — Corte histológico do fígado mostrando áreas íntegras e áreas comprometidas pelo parasito. Coloração H. E. (X 100).

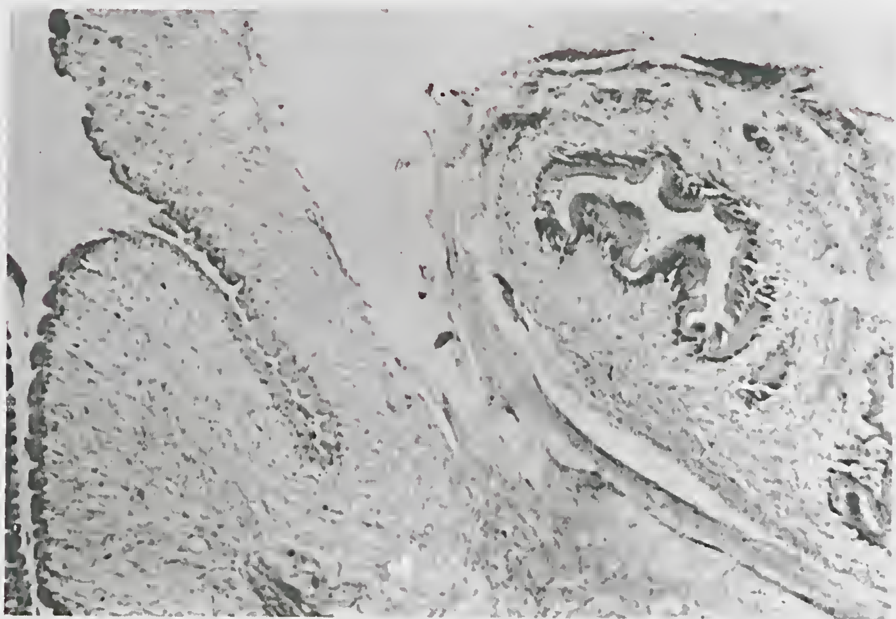


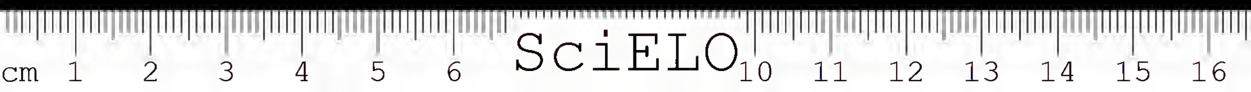
Fig. 6 — Corte histológico do epiploon contendo segmento do parasito com reação fibrosa. Coloração H. E. (X 100).

## ÍNDICE DAS ESPÉCIES









Mem. Inst. Butantan
*38*: 69-118, 1974

# NOTA SOBRE A FREQÜÊNCIA DE HEMOPARASITAS EM SERPENTES DO BRASIL *

SAMUEL B. PESSÔA****
PERSIO DE BIASI**
e GIUSEPPE PUORTO***

*RESUMO* — Os autores relatam os resultados de pesquisa de hemoparasitas no sangue de mais de 2.000 serpentes pertencentes a 24 gêneros e 45 espécies, peçonhentas ou não, capturadas principalmente na região centro-sul do Brasil. Verificaram que os seguintes gêneros de hemoparasitas foram encontrados nas serpentes brasileiras: *Hepatozoon*, *Haemogregarina* (s. s.), *Plasmodium*, *Trypanosoma e Toddia.* A maioria dos hemoparasitas encontrados pertencem aos gêneros *Hepatozoon*, parasitando até mais de 70% de uma mesma espécie, como por exemplo *Cyclagras gigas;* menos freqüente é *Haemogregarina pallida*, a única espécie do gênero *Haemogregarina* (s. s.), encontrada no sangue de um único exemplar de *Thamnodynastes pallidus nattereri.*

Em algumas espécies de serpentes os autores não encontraram hemoparasitas (gênero *Micrurus* e *Bothrops insularis*).

Espécies de *Trypanosoma* são muito freqüentes em algumas serpentes, como por exemplo *Rachidelus brazili* (28% de 21 exemplares examinados). Poucas serpentes são parasitadas por *Plasmodium*, todavia, 8% dos 164 exemplares de *Bothrops moojeni* estavam infectados por este hemoparasita.

Finalmente, algumas espécies de serpentes, como *Bothrops pradoi* e *Philodryas olfersii* são parasitadas (10%) pelo gênero *Toddia* (provavelmente um "virus").

Nenhuma microfilária foi encontrada no sangue das serpentes.

*UNITERMOS* — Freqüência de hemoparasitas; Serpentes; Sangue; *Plasmodium; Hepatozoon; Trypanosoma; Haemogregarina* (s. s.); *Toddia; Microfilária.*

## INTRODUÇÃO

Como há vários anos (1967-1974) vimos estudando os hemoparasitas das serpentes do Brasil, resolvemos nesta nota fazer uma súmula estatística sobre a freqüência com que estes protozoários são encontrados parasitando as várias espécies de nossos ofídios.

Este trabalho compreende o resultado dos exames de aproximadamente 2.100 exemplares de serpentes, pertencentes a 24 gêneros e 45 espécies, peçonhentas ou não, capturadas principalmente na região Centro-Sul do país, feitos nas Seções de Herpetologia e de Venenos do Instituto Butantan.

---

* Trabalho executado com auxílio do Fundo de Pesquisas do Instituto Butantan.
** Do Instituto Butantan.
*** Bolsista do Instituto Butantan.

Endereço para correspondência:
C.P. 65 — 05504 — São Paulo — Brasil.

Das serpentes mais comuns foi examinado um número substancial de animais, sendo que, em relação às mais raras tivemos de nos contentar, às vezes, com poucos exemplares ou mesmo, um só.

Também pudemos fazer observações mais pormenorizadas sobre o hemoparasitismo de serpentes peçonhentas dos gêneros *Crotalus* e *Bothrops*, respectivamente "cascavel" e "jararacas", pelo fato de chegarem em maior número na Seção de Venenos do Instituto Butantan.

Outro motivo que nos levou a publicar esta nota foi o fato de, até hoje, não terem sido divulgados dados estatísticos sobre a prevalência dos diversos hemoparasitas nas nossas serpentes.

Aliás, também não nos parecem ser muito numerosos os estudos nesse sentido em outros países; sem nos aprofundarmos na bibliografia podemos citar os trabalhos de Ewers (1968), que estudou os hematozoários dos répteis da Nova Guiné, tendo encontrado somente hemogregarinas (s. l.) em 17 de 23 serpentes examinadas ou seja 74% infetadas. Não registrou o encontro de *Trypanosoma*, *Toddia* ou *Pirhemocyton* e *Plasmodium*. Hull e Camin (1960), nos EE.UU. registraram o encontro de 154 serpentes infetadas por *Hepatozoon*, em 600 examinadas, ou seja, a percentagem de 30,5%. Não relatam o encontro de outros hemoparasitas. Anteriormente, estes autores (1956) tinham feito um inquérito nas serpentes do Parque Zoológico de Chicago e encontraram a taxa de 42,4% parasitados por *Hepatozoon*; um ano mais tarde a taxa de infecção caiu para 23,1% nesta mesma população cativa. Também estes autores assinalaram a presença de microfilarias em dois exemplares, porém, nós em mais de 2.000 ofídios examinados nunca tivemos ocasião de assinalar microfilárias no sangue destes animais.

## MATERIAL E MÉTODOS

Nas serpentes foram feitos exames de sangue, a fresco e esfregaços fixados com metanol e corados pelo Giemsa ou, às vezes, May Grünwald-Giemsa.

As serpentes examinadas foram numeradas compreendendo diversas séries. A primeira série recebeu número, sem prefixo de letras; a segunda série recebeu o prefixo N.S. — (o que nos levou a iniciar esta Nova Série foi o fato de não precisarmos trabalhar com números elevados); posteriormente, designamos uma série H — para as serpentes examinadas na Seção de Venenos; outra F — para os filhotes; e a série G — para as serpentes prenhes.

As lâminas que julgamos importantes para arquivo receberam uma sequência numérica constituindo uma única série não precedida por letra e se acham todas na Coleção do Instituto Butantan.

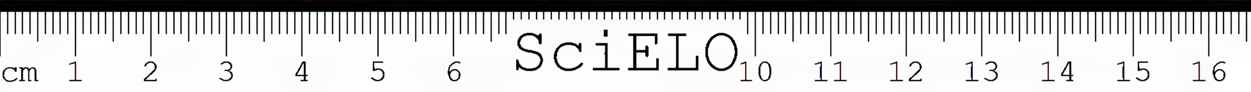
---

1956 — HULL, R. W. — Jour. Parasitol. *42* (*suppl.*): 36.

1960 — HULL, R. W., e CAMIN, J. H. — Jour. Parasitol. *46*:515-523.

1968 — EWERS, W. H. — Jour. Parasitol. *54*(1):172-174.





PESSÔA, S. B., BIASI, P. & PUORTO, G. — Nota sobre a frequencia de hemoparasitas em serpentes do Brasil.

*Mem. Inst. Butantan, 38*: 69-118, 1974.

As microfotografias foram feitas com aumentos que variaram entre 1.000 e 2.000 diâmetros; os casos de aumento maior são indicados no texto. Representam elas formas sangüíneas consideradas em geral como gametócitos e formas tissulares, que são formas esquizogônicas, as quais muitos autores separam em macrocisto com numerosos esquizontes pequenos e microcistos, em geral com 2 a 6 esquizontes maiores.

Quanto às citações bibliográficas, nos restringimos às que se referem às descrições originais da espécie e algumas às descrições das formas evolutivas até agora conhecidas ou outra particularidade importante.

Os nomes específicos das serpentes aqui citadas estão baseados no Catálogo de Peters e Orejas-Miranda (1970).

Família Viperidae:

1 — *Bothrops alternatus* ("urutu, cruzeira"), figs. 1-5.

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Examinados | ........................ | 23 | | |
| Parasitados por: *Hepatozoon* | ......... | 4 | ... | 17% |
| *Toddia* | ............. | 1 | | |

O *Hepatozoon* desta espécie foi descrito por Phisalix e Laveran em 1913 com o nome de *Haemogregarina roulei* (= *Hepatozoon roulei*). Sua evolução foi feita no *Culex dolosus* por Pessôa e cols. 1972.

BIBLIOGRAFIA

1913 — PHISALIX, MME. — C. R. Soc. Biol. pp. 110-111.

1913 — PHISALIX, MM., LAVERAN, A. — Bull. Soc. Path. Exot. *6*: 330-333.

1967 — PESSÔA, S. B. — Rev. Bras. Biol. *27*(*2*): 159-164.

1972 — PESSÔA, S. B., BIASI, P. e SOUZA, D. M. — Mem. Instituto Butantan *36*: 241-245.

---

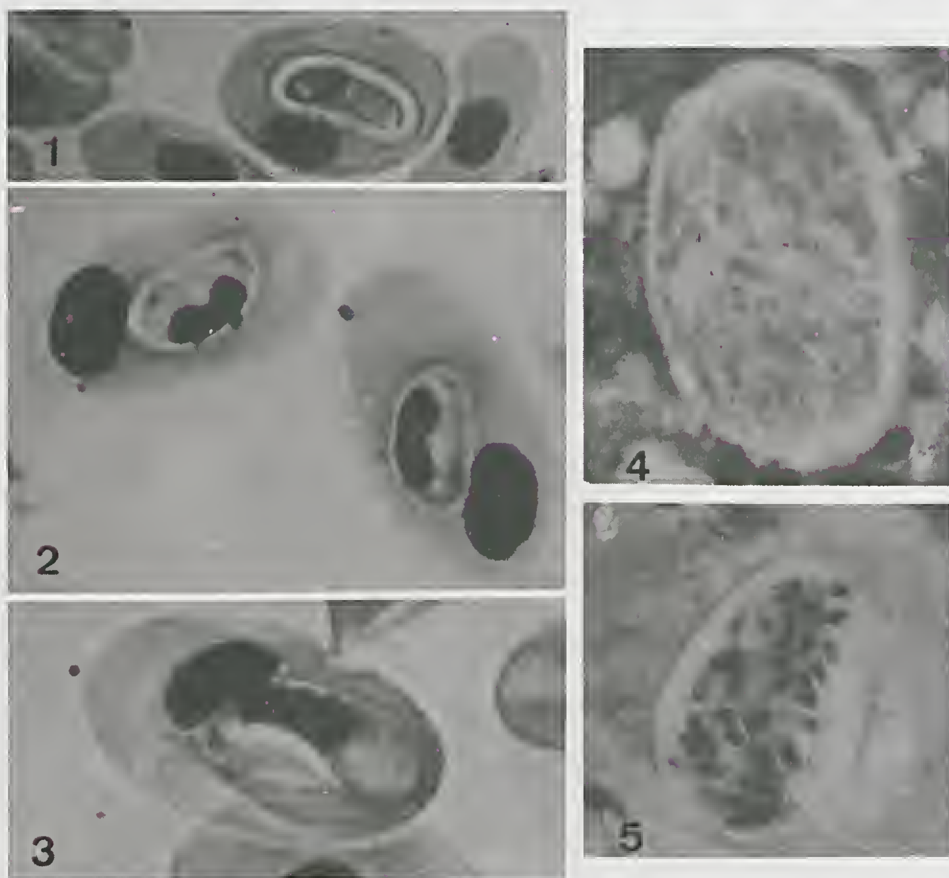
1970 — PETERS, J. A. e OREJAS-MIRANDA, B. — Catalogue of the Neotropical Squamata Part I. Snakes, Smithsonian Institution Press, Washington.





PESSÔA, S. B., BIASI, P. & PUORTO, G. — Nota sobre a frequencia de hemoparasitas em serpentes do Brasil.
*Mem. Inst. Butantan, 38*: 69-118, 1974.

Figs. 1-5




*Hepatozoon* da *Bothrops alternatus*

Figs. 1-3, formas sangüíneas
Figs. 4 e 5, formas tissulares (cistos esquizogônicos).

2 — *Bothrops cotiara* ("cotiara")
Examinados ........................ 8

3 — *Bothrops insularis* ("jararaca ilhoa")
Examinados ........................ 6

Nestas espécies não foram encontrados hemoparasitas.

4 — *Bothrops jararaca* ("jararaca"), figs. 6-11.

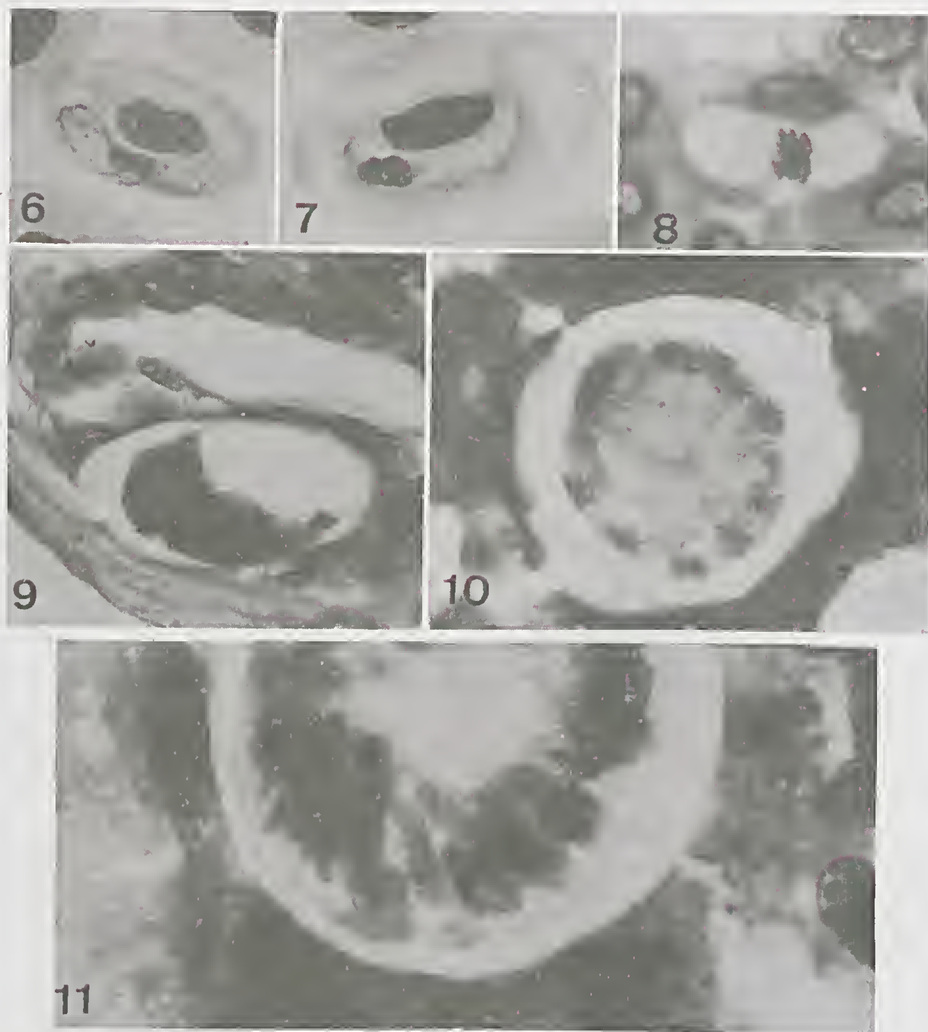
| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Examinados | | 131 | | |
| Parasitados por: | *Hepatozoon* | 31 | ... | 24% |
| | *Toddia* | 3 | ... | 2% |

O *Hepatozoon* desta espécie foi por nós identificado à *Haemogregarina plimmeri* Sambon, 1909 e redescrita por Phisalix e Laveran em 1913.

BIBLIOGRAFIA

1909 — SAMBON, W. — J. Trop. Med. Hyg. *12*: 48-55.
1913 — PHISALIX, MM. e LAVERAN, A. — Bull. Soc. Path. Exot. *6*:330-332.
1967 — PESSÔA, S. B. — Rev. Bras. Biol. *27*(*2*): 159-164.

FIGURAS 6-11




*Hepatozoon* da *Bothrops jararaca*

Figs. 6-8 — Formas sangüíneas.

Figs. 9-11 — Formas tissulares (cistos esquizogônicos; fig. 11, aumento x 2500).

5 — *Bothrops jararacussu* ("jararacussu"), figs. 12 e 13.

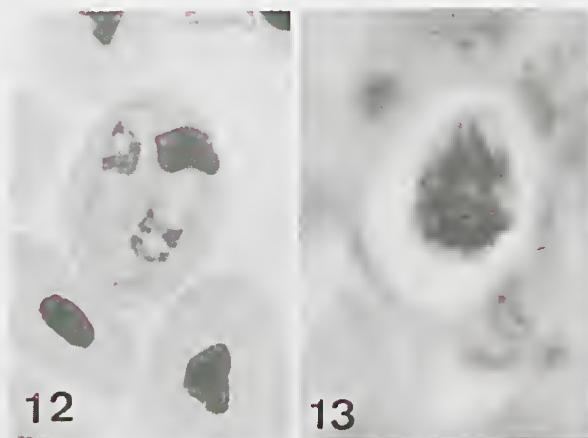
| | | | |
|---|---|---|---|
| Examinados ........................ | 8 | | |
| Parasitados por: *Hepatozoon* ......... | 3 | ... | 37% |

O hepatozoon desta espécie foi descrito por Pessôa em 1968, como *Haemogregarina jararacussu.*

BIBLIOGRAFIA

1968 — PESSÔA, S. B. — Rev. Brasil. Biol. *28(1)*: 71-76.

FIGURAS 12 e 13




*Hepatozoon* da *Bothrops jararacussu*

Fig. 12 — Forma sangüínea.

Fig. 13 — Forma tissular (cisto esquizogônico).

6 — *Bothrops moojeni* ("caiçaca ou jararacão"), figs. 14-19.

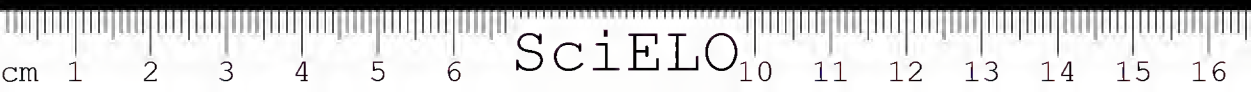
| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Examinados | | 164 | | |
| Parasitados por: | *Hepatozoon* | 58 | ... | 35% |
| | *Plasmodium* | 13 | ... | 8% |
| | *Toddia* | 1 | | |

O seu *Hepatozoon* foi descrito por Pessôa e cols. (1971) admitindo-se como identificado ao *Hepatozoon plimmeri* (Sambon, 1909) parasita da *B. jararaca*. Sua evolução foi realizada pelos mesmos autores, no *Culex dolosus*.

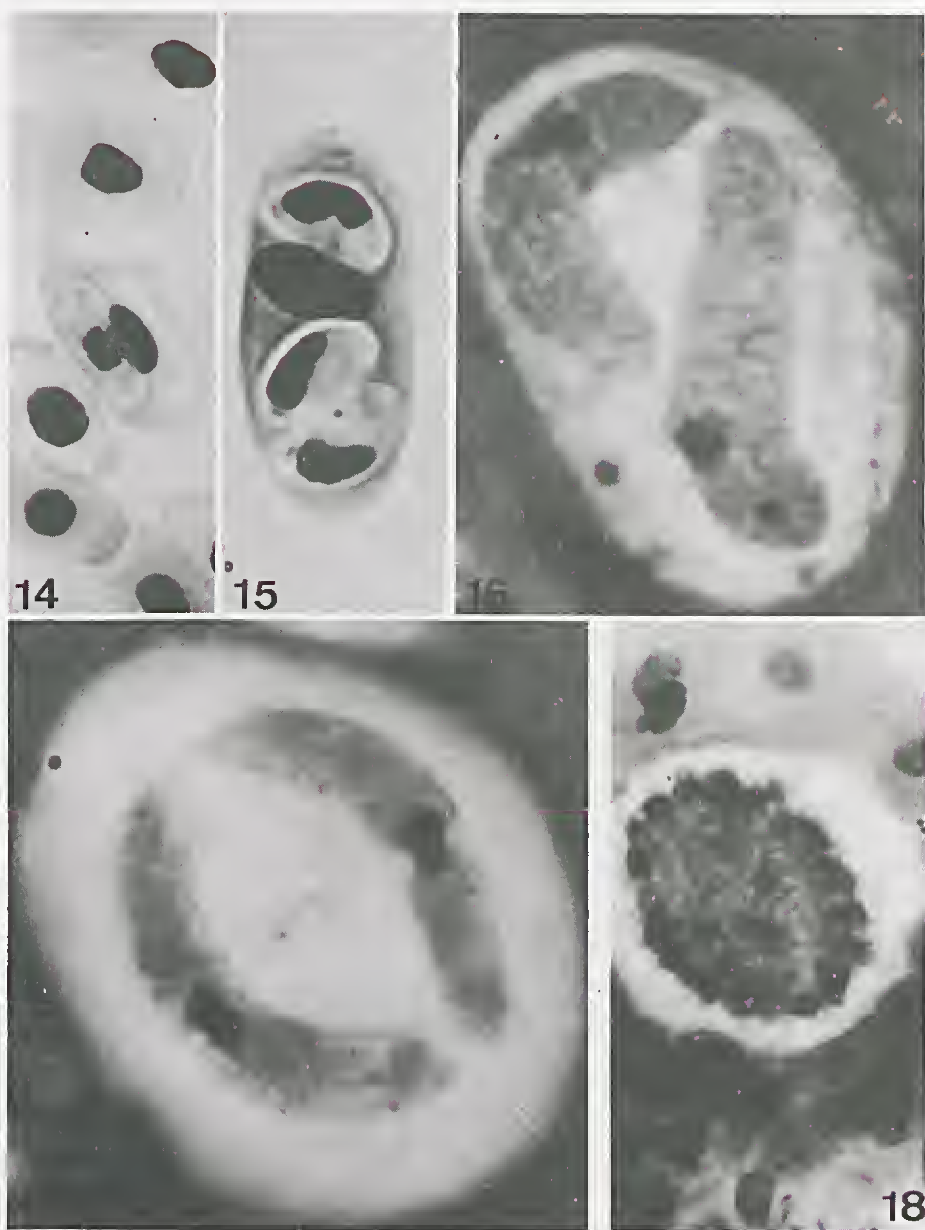
BIBLIOGRAFIA

1971 — PESSÔA, S. B., BELLUOMINI, H. F., BIASI, P. e SOUZA, D. M. — Arq. Instituto Biológico S. Paulo, *38(4)*: 253-258.





FIGURAS 14-18

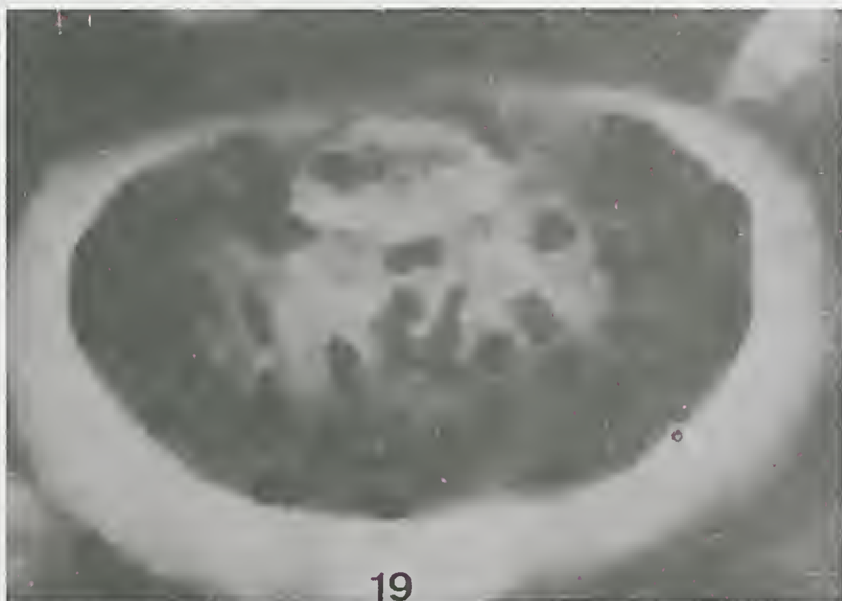



*Hepatozoon* da *Bothrops moojeni*

Figs. 14 e 15 — Formas sangüíneas.

Figs. 16 - 18 — Formas tissulares (cistos esquizogônicos; figs. 16 e 17, aumento × 2500).

Figura 19




*Hepatozoon* da *Bothrops moojeni*

Fig. 19 — Forma tissular (cisto esquizogônico, aumento × 2500)

7 — *Bothrops neuwiedi* ("jararaca-pintada"), figs. 20-22.

| | | |
|---|---|---|
| Examinados ........................ | 62 | |
| Parasitados por: *Hepatozoon* ......... | 24 | ... 39% |

Não foram aqui consideradas as diversas subespécies de *B. neuwiedi*, de modo que a freqüência dos parasitas foi analisada como ocorrendo na espécie.

O *Hepatozoon* desta serpente foi assinalado em 1916 por Migone, no Paraguai, sem lhe dar nome específico. Não encontramos nenhum outro hemoparasita além do hepatozoon. A transmissão congênita do Hepatozoon nesta espécie foi verificada por Biasi e cols. (1971).

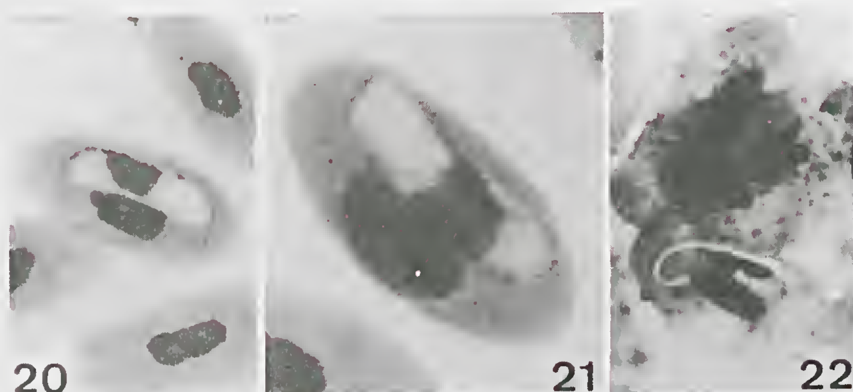
BIBLIOGRAFIA

1916 — MIGONE, L. E. — Bull. Soc. Path. Exot. *9*: 359-364.

1968 — PESSÔA, S. B. — Rev. Brasil. Biol. *28(1)*: 71-76.

1971 — BIASI, P., PESSÔA, S. B. e BELLUOMINI, H. E. — Atas Soc. Biol. do Rio de Janeiro *15(1)*: 27, 28.

FIGURAS 20-22




*Hepatozoon* da *Bothrops neuwiedi*

Figs. 20 e 21 — Formas sangüíneas (fig. 21, aumento × 2500).

Fig. 22 — Forma sangüínea na membrana córío-alantóide do embrião.

8 — *Bothrops pradoi* — figs. 23-25.

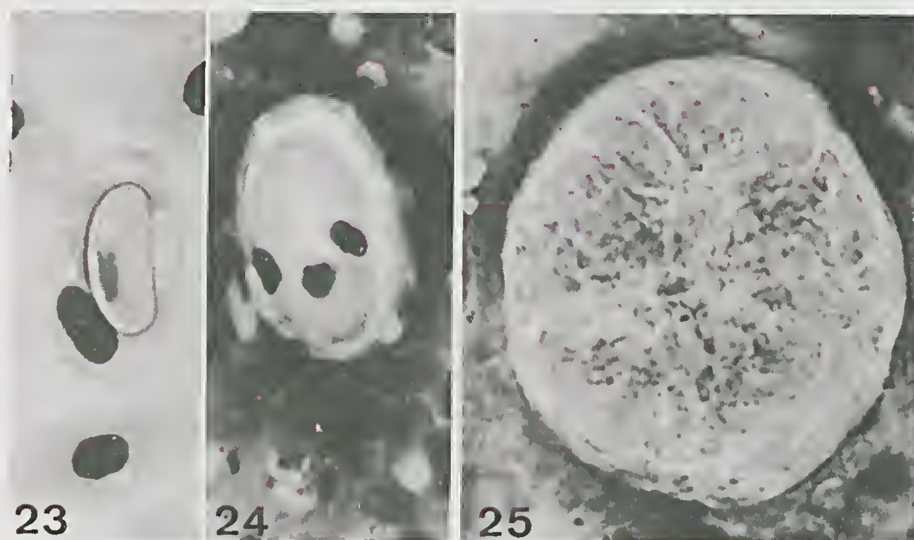
| | | | |
|---|---|---|---|
| Examinados ........................ | 100 | | |
| Parasitados por: *Hepatozoon* ......... | 46 | ... | 46% |
| *Toddia* ............. | 10 | ... | 10% |

Esta espécie foi uma das mais altamente parasitadas que encontramos, tanto pelo *Hepatozoon* como por *Toddia*. O *Hepatozoon* não foi assinalado anteriormente por nenhum pesquisador; a *Toddia* foi estudada por M.A. de Souza e Cols. (1973).

## BIBLIOGRAFIA

1973 — SOUZA, M. A., BIASI, P. e PESSÔA, S. B. — Mem. Instit. Oswaldo Cruz *71(4)*: 443-480.

FIGURAS 23-25




*Hepatozoon* da *Bothrops pradoi*

Fig. 23 — Forma sangüínea.

Figs. 24 e 25 — Formas tissulares (cistos esquizogônicos).

9 — *Crotalus* (*Crotalus*) *durissus*. ("cascavel") — figs. 26-32.

| | | | |
|---|---|---|---|
| Examinados | ........................ | 300 | |
| Parasitados por: | *Hepatozoon* ......... | 34 | ... 11% |
| | *Trypanosoma* ....... | 5 | ... 1,5% |

Como se sabe foram descritas várias subespécies de *Crotalus* (*C.*) *durissus* de Lineu. Os parasitas desta espécie com suas diversas subespécies são aqui considerados em bloco como parasitando uma única espécie, esclarecendo-se que a quase totalidade de exemplares examinados corresponde à *C. d. terrificus* e *C. d. collilineatus*. Nestas serpentes encontramos no sangue espécie de *Hepatozoon* e *Trypanosoma*.

O primeiro autor a assinalar o *Hepatozoon* na cascavel foi Lutz em 1901, que considerando todas as espécies parasitas de serpentes como uma única, a denominou *Hemogregarina serpentium* (= *Hepatozoon serpentium*). Laveran em 1902 descreveu a *Haemogregarina crotali* no *C. confluens* (= *C. atrox*); Luhe descreveu nesta espécie o *Karyolysus crotali* e Phisalix em 1931 duas outras espécies: *Haemogragarina romani* e *H. capsulata*. O tripanosoma da cascavel foi descrito por Pessôa e Biasi em 1972, com o nome de *Trypanosoma cascavelli*, parasitando o *C. d. terrificus*.

BIBLIOGRAFIA

1901 — LUTZ, A. — Zentrlb. f. Bak. 1 Abd. Orig. *29*: 290-397.

1902 — LAVERAN, A. — C. Rend. Sean. Acad. Sc. Paris *135*: 1036-1040.

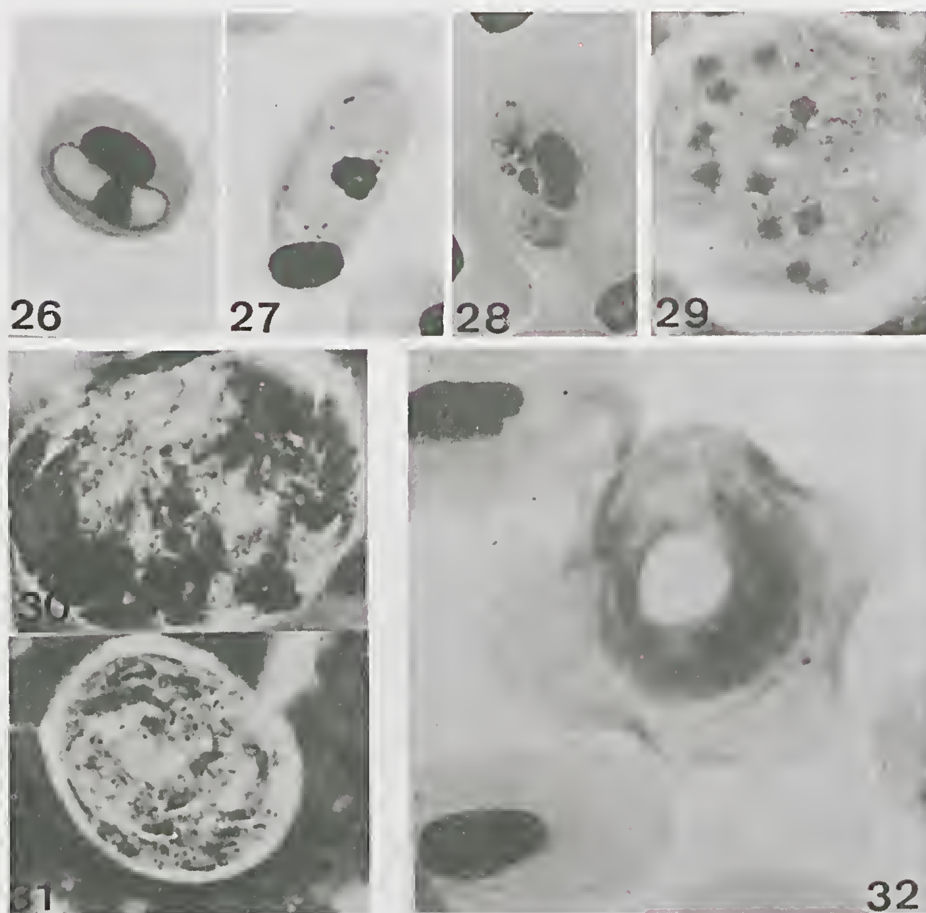
1931 — PHISALIX, M. — Bull. Soc. Path. Exot. *24*: 190-194.

1967 — PESSÔA, S. B. — Rev. Brasil. Biol. *27(4)*: 381-384.

1972 — PESSÔA, S. B. e BIASI, P. — Atas Soc. Biol. Rio de Janeiro *15(2)*: 67-70.

PESSÔA, S. B., BIASI, P. & PUORTO, G. — Nota sobre a frequencia de hemoparasitas em serpentes do Brasil.
*Mem. Inst. Butantan, 38*: 69-118, 1974.

FIGURAS 26-32




Hemoparasitas da *Crotalus durissus*

Figs. 26-28 — Formas sanguíneas do *Hepatozoon.*

Figs. 29-31 — Formas tissulares (cistos esquizogônicos), do *Hepatozoon.*

Fig. 32 — *Trypanosoma cascavelli* (aumento × 2500).

PESSÔA, S. B., BIASI, P. & PUORTO, G. — Nota sobre a frequencia de hemoparasitas em serpentes do Brasil.
*Mem. Inst. Butantan, 38*: 69-118, 1974.

## Familia Boidae

10 — *Boa constrictor* ("jibóia"), figs. 33-37.

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Examinados | | 29 | | |
| Parasitados por: | *Hepatozoon* | 18 | ... | 62% |
| | *Trypanosoma* | 4 | ... | 14% |

Lutz, 1901, assinalou a presença de hepatozoon nesta serpente; Sambon a descreveu sob o nome de *Haemogregarina terzii* em 1909. Plimmer também a assinalou em 1914 e Carini, 1917, a descreveu com o nome de *Haemogregarina* (*Karyolysus*) *juxtanuclearis*. O tripanosoma encontrado na jibóia foi descrito por Pessôa e Fleury com o nome de *Trypanosoma constrictor* em 1969. Neste mesmo ano Ball e cols. descreveram uma nova espécie parasita desta serpente, o *Hepatozoon fusiflex*.

### BIBLIOGRAFIA

1901 — LUTZ, A. — Zentrlb. f. Bak. 1 Abd. Orig. *29*: 390-397..

1909 — SAMBON. W. — J. Trop. Med. Hyg. *12*: 48-55.

1914 — PLIMMER, H. — Proc. Zool. Soc. London pp. 181-190.

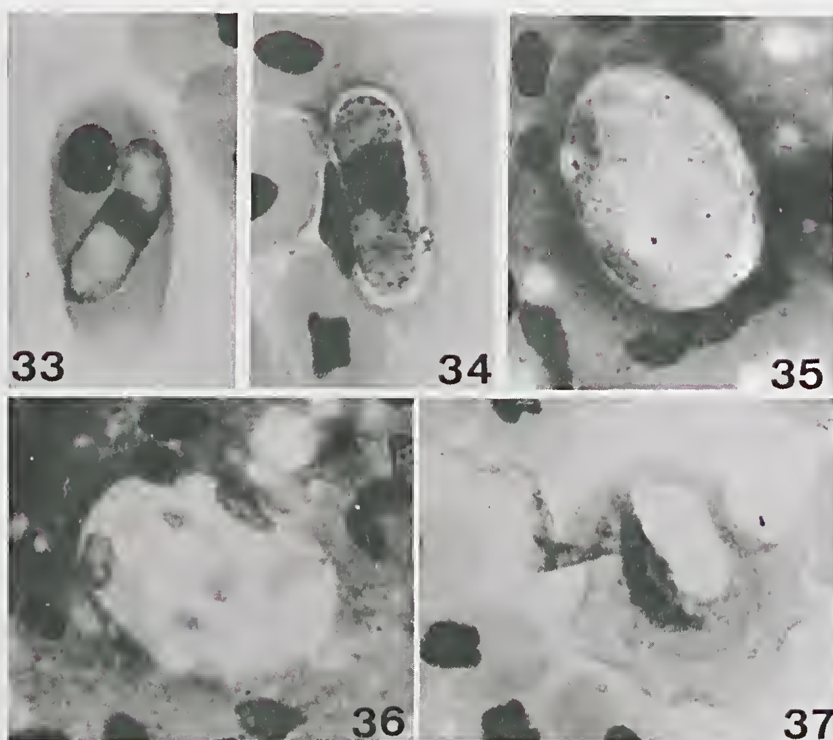
1947 — CARINI, A. — Arq. Biol. *31(279)*: 61-63.

1967 — PESSÔA, S. B. — Rev. Bras. Biol. *27(1)*: 49-56.

1969 — PESSÔA, S. B. e FLEURY, G. C. — Rev. Bras. Biol. *29(1)*: 81-86.

1969 — BALL, G.H., CHAO, J. e TELFORD JR., S.R. — Jour. Parsit. *55(4)*: 800-813.

FIGURAS 33-37




*Hemoparasitas* da *Boa constrictor*

Figs. 33 e 34 — Formas sanguíneas, do *Hepatozoon*.

Figs. 35 e 36 — Formas tissulares (cistos esquizogônicos), do *Hepatozoon*.

Fig. 37 — *Trypanosoma constrictor*.

11 — *Corallus caninus* ("cobra-papagaio"), figs. 38-40.

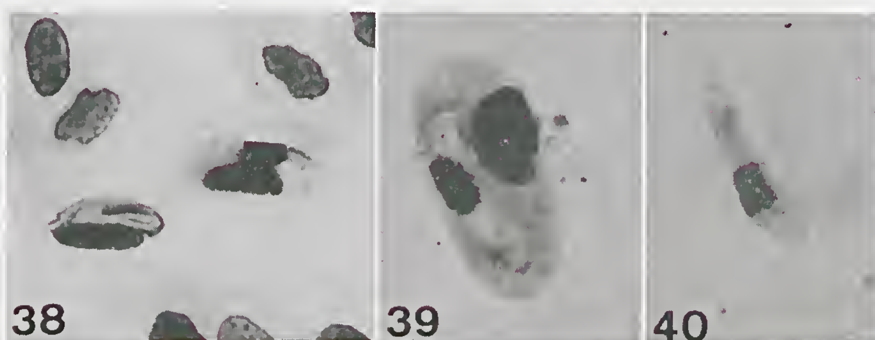
A *Haemogregarina* da *Corallus caninus* foi descrita por Brimont (1909) em cobra da Guiana Francesa que lhe não deu nome específico. Pessôa e cols. admitiram tratar-se de *H. luhei* e conseguiram o desenvolvimento desta espécie, proveniente do Amapá, no mosquito *Culex fatigans* (1970). Examinamos somente dois exemplares da *Corallus caninus*, sendo que somente um estava com *Hepatozoon*.

BIBLIOGRAFIA

1909 — BRIMONT, E. C. — R. Soc. Biol., Paris, *67*: 169-171.

1970 — PESSÔA, S. B., CAVALHEIRO, J. e SOUZA, D. M. — Arq. Instituto Biológico, São Paulo *37(3)*: 205-211.

FIGURAS 38-40




*Hepatozoon* da *Corallus caninus*

Figs. 38-40 — Formas sanguíneas (fig. 40, está livre no sangue).

12 — *Corallus hortulanus*, figs. 41-47.

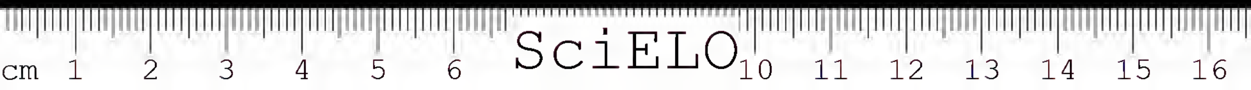
| | | | |
|---|---|---|---|
| Examinados | | 9 | |
| Parasitados por: | *Hepatozoon* | 6 | ... 67% |
| | *Plasmodium* | 1 | |

Em 1970, Pessôa e cols. consideraram como sendo o hepatozoon parasita desta serpente pertencente à espécie *Haemogregarina luhei*. Naquele trabalho citam além das formas sangüíneas, também formas tissulares do parasita.

BIBLIOGRAFIA

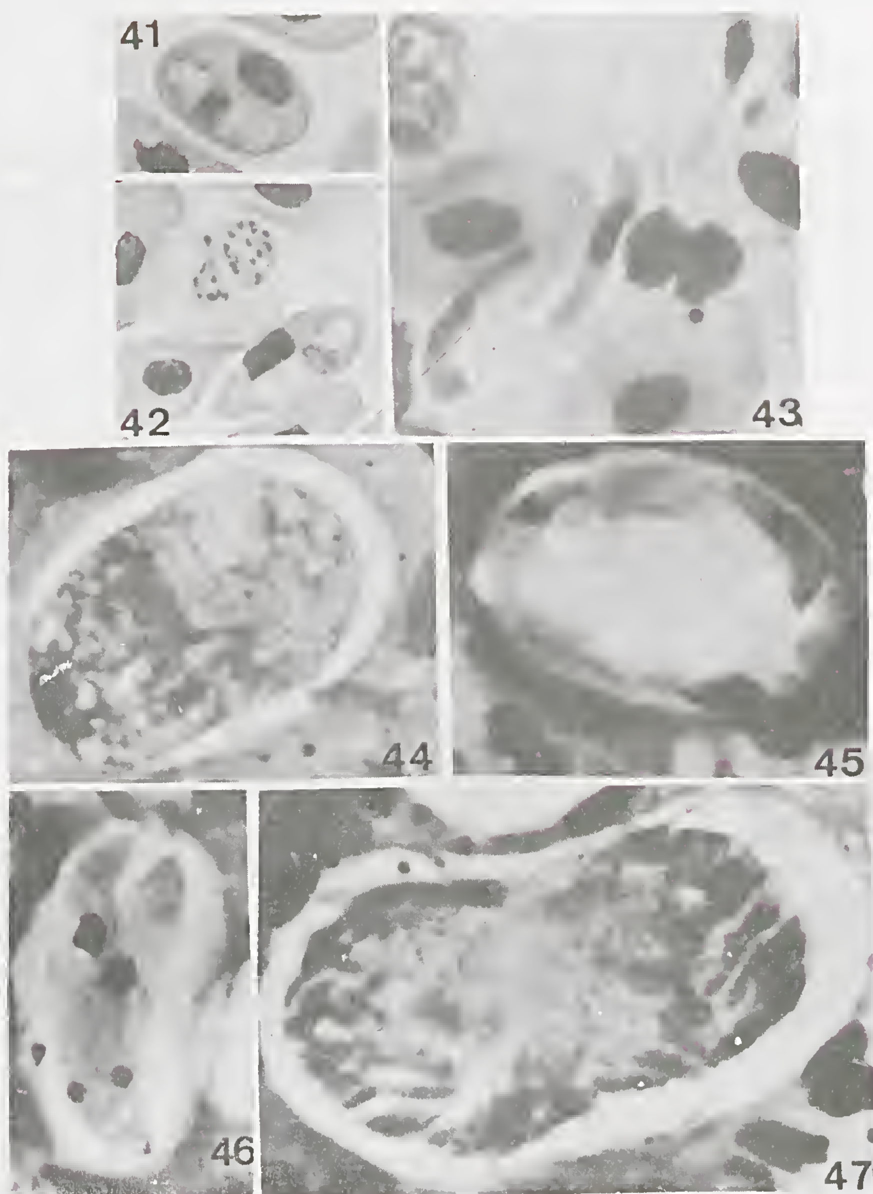
1970 — PESSÔA, S. B., CAVALHEIRO, J. e SOUZA, D. M. — Arq. Instituto Biológico, S. Paulo *37(3)*: 205-211.





PESSÔA, S. B., BIASI, P. & PUORTO, G. — Nota sobre a frequencia de hemoparasitas em serpentes do Brasil.
*Mem. Inst. Butantan, 38*: 69-118, 1974.

FIGURAS 41-47




Hemoparasitas da *Corallus hortulanus*

Fig. 41 — Forma sangüínea do *Hepatozoon*.
Fig. 42 — Forma sangüínea do *Hepatozoon* e esquizonte do *Plasmodium*, em glóbulos diferentes.
Fig. 43 — Forma sangüínea livre, do *Hepatozoon*.
Figs. 44-47 — Formas tissulares (cistos esquizogônicos), do *Hepatozoon*. (fig. 47, aumento × 2500).

13 — *Epicrates cenchria crassus* ("salamanta"), figs. 48-49.

| | | | |
|---|---|---|---|
| Examinados ........................ | 37 | | |
| Parasitados por: *Hepatozoon* ......... | 6 | ... | 16% |
| *Trypanosoma* ....... | 1 | | |

As cobras do gênero *Epicrates* que se assemelham à jibóia, são denominadas salamantas; a única espécie deste gênero por nós estudada foi a *Epicrates cenchria crassus*. Darling (1912), no Panamá, assinalou hemogregarina em serpentes do gênero *Epicrates;* a hemogregarina do *E. cenchria* foi descrita em 1931 na Venezuela por Phisalix. O seu tripanosoma foi descrito por Pessôa e Fleury, que o denominaram *Trypanosoma salamantae* (1969).

BIBLIOGRAFIA

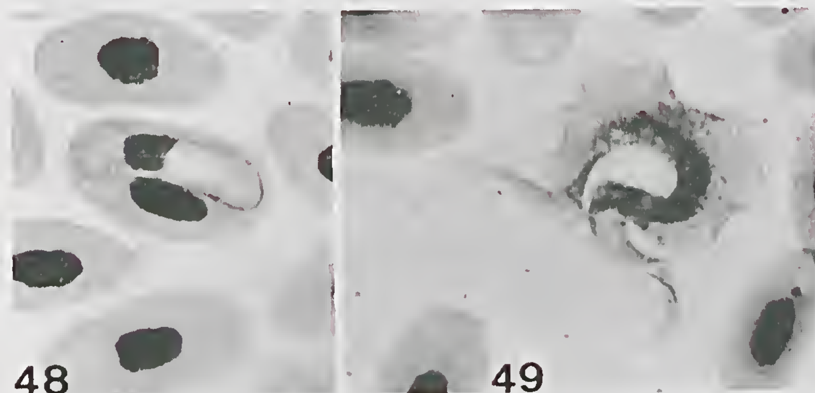
1912 — DARLING, S. T. — Bull. Soc. Path. Exot. *5*: 71-73.

1931 — PHISALIX, Mme. — Bull. Soc. Path. Exot. *24*: 187-190.

1969 — PESSÔA, S. B. e FLEURY, G. C. — Rev. Bras. Biol. *29(1)*: 81-86.

1969 — PESSÔA, S. B. e CAVALHEIRO, J. — Rev. Bras. *29(3)*: 351-354.

FIGURAS 48 e 49




Hemoparasitas da *Epicrates cenchria crassus*

Fig. 48 — Forma sangüínea do *Hepatozoon*.

Fig. 49 — *Trypanosoma salamantae*.

14 — *Eunectes murinus* ("sucuri") — figs. 50 — 52

| | | | |
|---|---|---|---|
| Examinados | 19 | | |
| Parasitados por: *Hepatozoon* | 10 | ... | 53% |

Desta espécie, vulgarmente denominada "sucuri", o *Hepatozoon* foi assinalado em 1901 por Lutz e em 1909 por Brimont. Em 1910 foi descrito por Hartmann e Chagas que o denominaram *Haemogregarina lutzi*. Posteriormente foi assinalada por Plimmer (1914-1916); Migone (1916); Carini (1947).

BIBLIOGRAFIA

1909 — BRIMONT, E. — C. R. Soc. Biol. *67*: 169-171.

1910 — HARTMANN, M. e CHAGAS, C. — Arch. fur Protistenk. *20(3)*: 35-36.

1912 — PLIMMER, H. — Proc. Zool. Soc. 1912: 406-419.

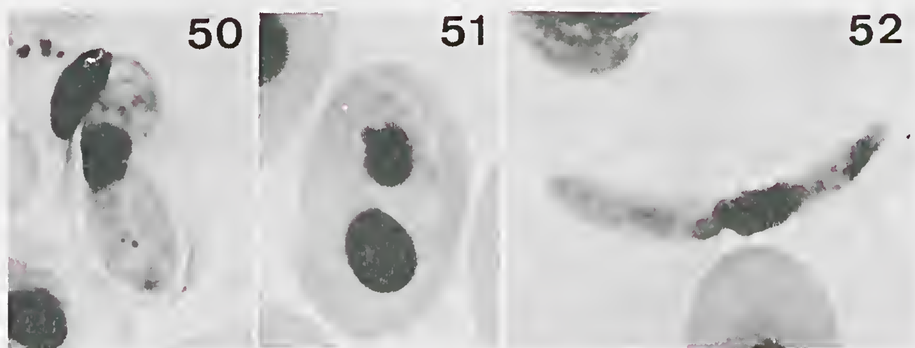
1914 — PLIMMER, H. — Proc. Zool. Soc. 1914: 181-190.

1915 — PLIMMER, H. — Proc. Zool. Soc. 1915: 123-130.

1947 — CARINI, A. — Arq. Biol. *31(279)*: 61-63.

1916 — MIGONI, L. E. — Bull. Soc. Path. Exot. *9*: 359-364.

FIGURAS 50-52




*Hepatozoon* da *Eunectes murinus*

Figs. 50-52 — Formas sangüíneas (fig. 52, livre no sangue).

Família Elapidae

15 — *Micrurus corallinus* (coral-verdadeira)
Examinados ........................ 18

16 — *Micrurus lemniscatus* (coral-verdadeira)
Examinados ........................ 3

Estas duas espécies estavam negativas para hemoparasitas.

Família Colubridae

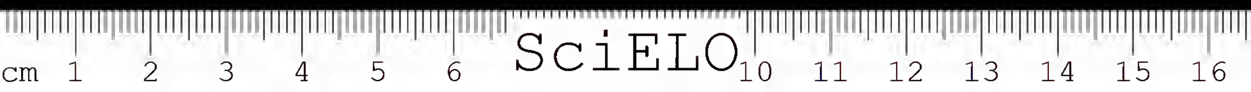
17 — *Chironius bicarinatus* ("cobra-cipó"), figs 53-58.
Examinados ........................ 30
Parasitados por: *Hepatozoon* ......... 5 ... 17%
*Plasmodium* ........ 1

O *Hepatozoon* desta espécie foi descrito por Pessôa e Cavalheiro, em 1969, quando pela primeira vez encontraram formas tissulares esquizogônicas. Descreveram aqueles autores como *Haemogregarina bicarinata* (= *Hepatozoon bicarinatus*).

BIBLIOGRAFIA

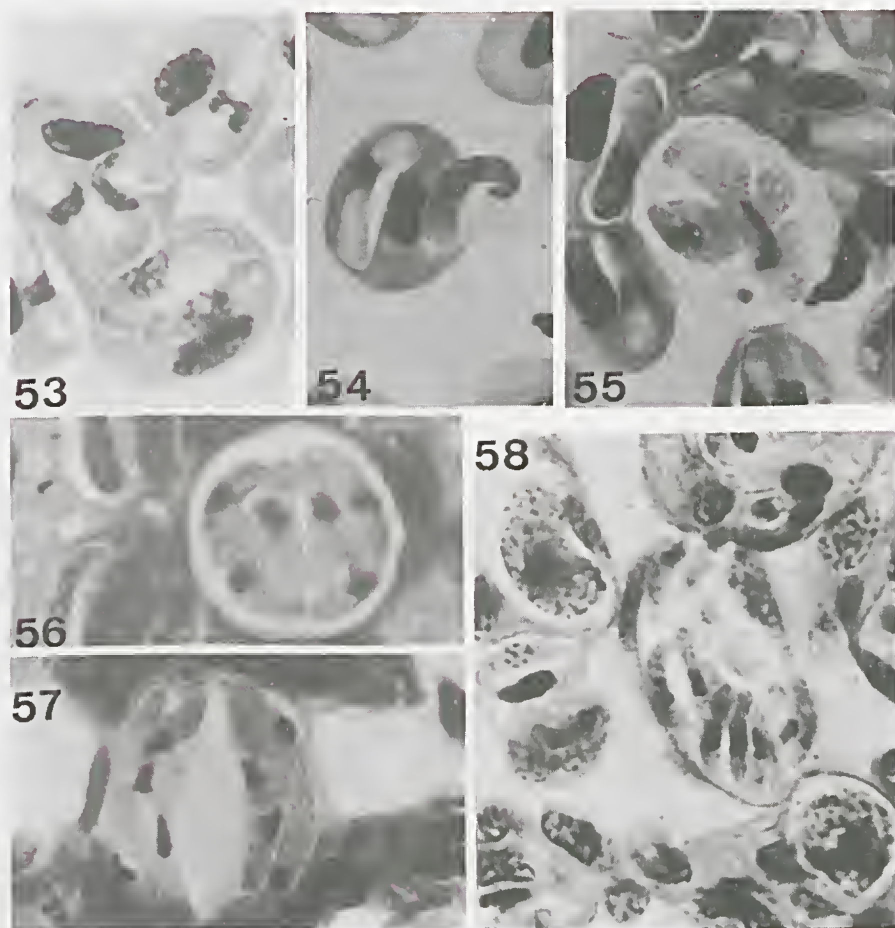
1969 — PESSÔA, S. B. e CAVALHEIRO, J. — Rev. Bras. Biol. *29*(*3*): 351-354.





PESSÔA, S. B., BIASI, P. & PUORTO, G. — Nota sobre a frequencia de hemoparasitas em serpentes do Brasil.
*Mem. Inst. Butantan*, *38*: 69-118, 1974.

FIGURAS 53-58




*Hepatozoon* da *Chironius bicarinatus*

Figs. 53 c 54 — Formas sangüíneas (na fig. 54, um *Hepatozoon* saindo do eritrócito).
Figs. 55 - 58 — Formas tissulares (cistos esquizogônicos).

18 — *Chironius flavolineatus* ("cobra-cipó"), figs. 59-66.

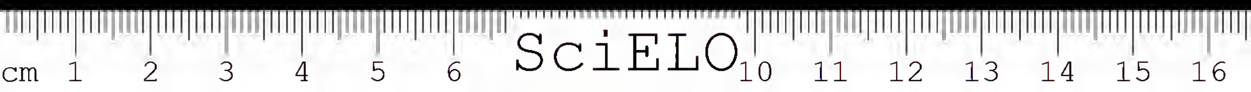
| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Examinados | ........................ | 17 | | |
| Parasitados por: | *Hepatozoon* ........ | 7 | ... | 41% |
| | *Toddia* ............ | 1 | | |

Pessôa (1967) descreveu o *Hepatozoon* desta serpente como *Haemogregarina chironiusi.*

BIBLIOGRAFIA

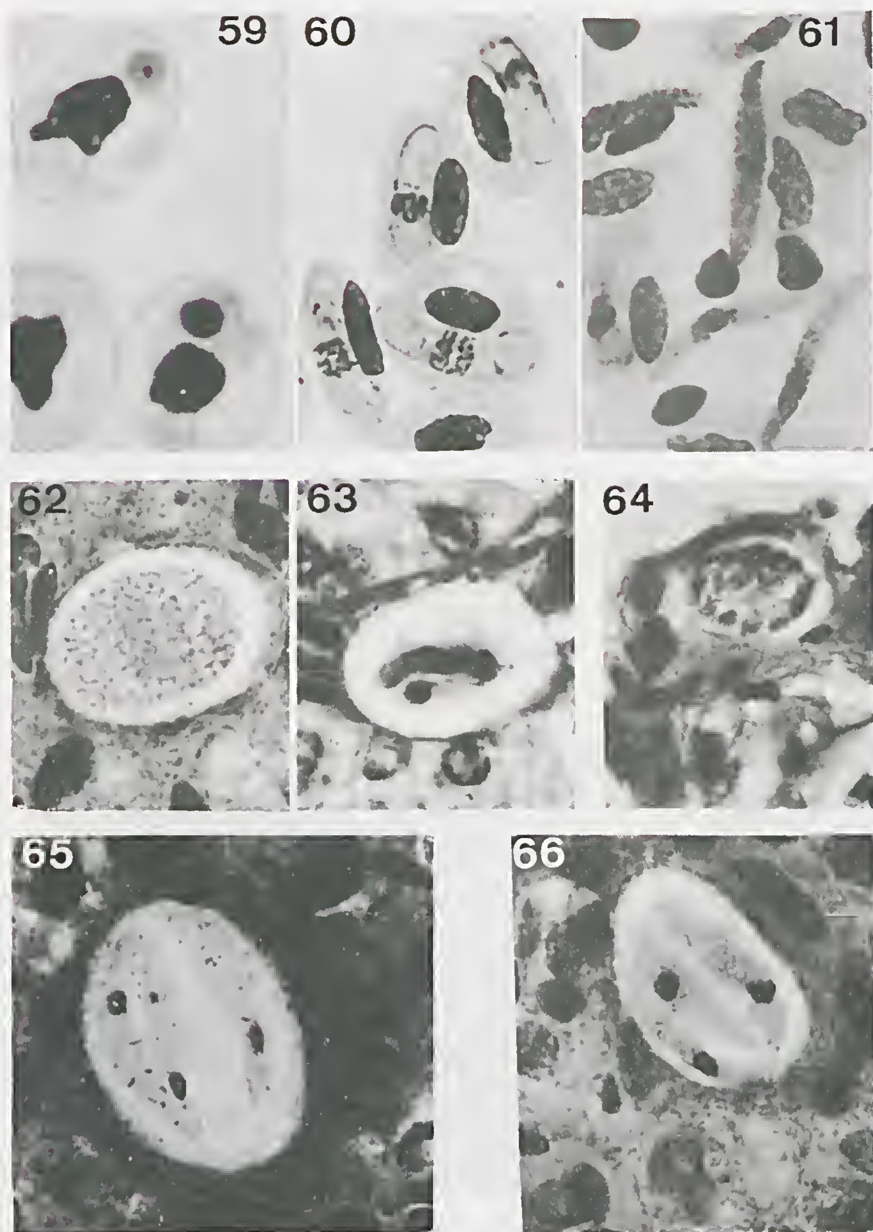
1967 — PESSÔA, S. B. — Rev. Bras. Biol. *27(1)*: 33-46.





PESSÔA, S. B., BIASI, P. & PUORTO, G. — Nota sobre a frequencia de hemoparasitas em serpentes do Brasil.
*Mem. Inst. Butantan, 38*: 69-118, 1974.

FIGURAS 59-66




Hemoparasitas da *Chironius flavolineatus*

Fig. 59 — *Toddia.*
Figs. 60 e 61 — *Hepatozoon*, formas sangüíneas (fig. 61, livre no sangue).
Figs. 62 - 66 — *Hepatozoon*, formas tissulares (cistos esquizogônicos).

19 — *Chironius foveatus*

| | | | |
|---|---|---|---|
| Examinados | 18 | | |
| Parasitados por: *Hepatozoon* | 2 | ... | 11% |

20 — *Chironius laevicollis* ("cobra-cipó"), figs. 67 — 69.

| | | |
|---|---|---|
| Examinados | | 2 |
| Parasitados por: | *Hepatozoon* | 1 |
| | *Toddia* | 1 |

Um único exemplar desta espécie encontrava-se parasitado por *Hepatozoon*, que foi descrito por Pessôa (1967), como *Haemogregarina laevicollis*. Outro encontrava-se parasitado por *Toddia*, que Pessôa (1966) denominou *Pyrhemocyton brazili*.

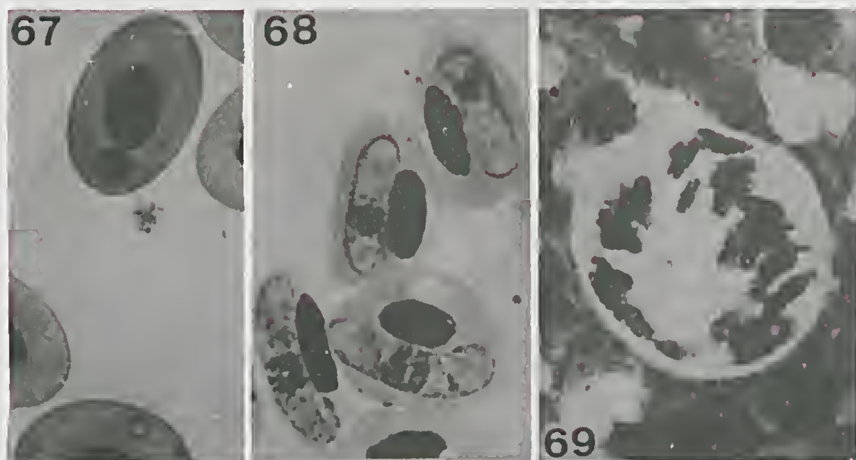
BIBLIOGRAFIA

1966 — PESSÔA, S. B. e CAMPOS, E. P. — Rev. Bras. Biol. *26(4)*: 417-423.

1967 — PESSÔA, S. B. — Rev. Brasil. Biol. *27(1)*: 41.

1967 — PESSÔA, S. B. — Rev. Brasil. Biol. *27(2)*: 159-164.

FIGURAS 67-69




Hemoparasitas da *Chironius laevicollis*

Fig. 67 — *Toddia.*

Fig. 68 — Forma sangüínea do *Hepatozoon.*

Fig. 69 — Forma tissular (cisto esquizogônico).

21 — *Cyclagras gigas* ("surucucu do pantanal"), figs. 70 — 72.

| | | | |
|---|---|---|---|
| Examinados .......................... | 7 | | |
| Parasitados por: *Hepatozoon* ......... | 5 | ... | 71% |

Schouten (1934) e Arantes (1934) denominaram, respectivamente, a hemogregarina de *H. migonei* e *H. cyclagrasi.* Segundo Pessôa e cols. (1970) provavelmente esta cobra é parasitada por duas espécies de *Hepatozoon,* uma que é transmitida por sanguessugas *Hepatozoon migonei* (Schouten, 1934) e outra por mosquito *Culex fatigans,* que é o *Hepatozoon cyclagrasi* (Arantes, 1934). Nesta espécie Fonseca (1935) descreveu o *Trypanosoma mattogrossensi,* que não encontramos nos sete especimens que examinamos.

## BIBLIOGRAFIA

1934 — ARANTES, J. V. — Rev. Biol. Hyg. S. Paulo *5*: 9.

1934 — SCHOUTEN, C. B. — Rev. Soc. Cient. Paraguay, *3*: 145-147.

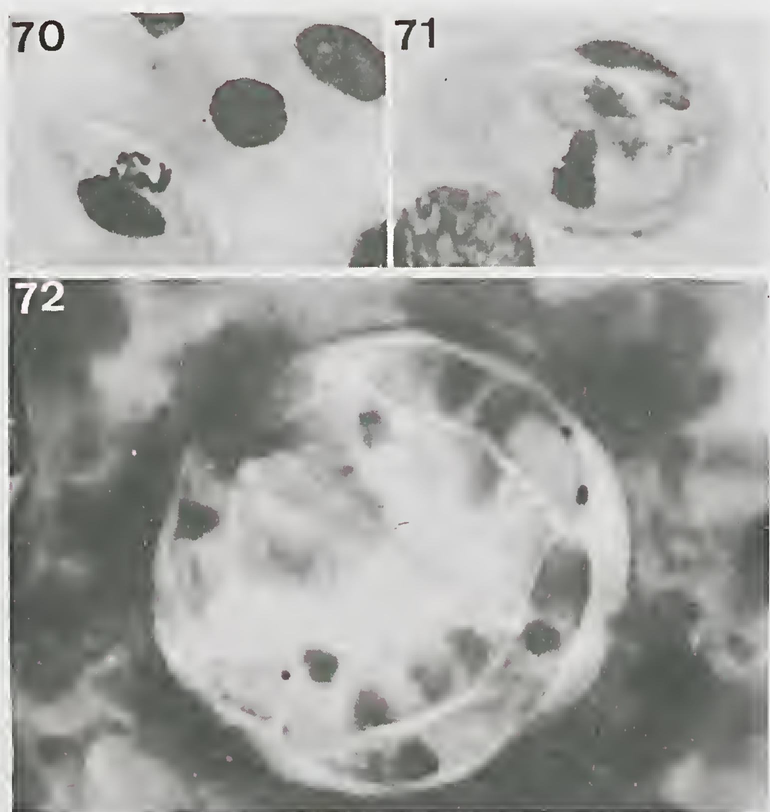
1935 — FONSECA, F. da — Mem. Instituto Butantan *9*: 189-191.

1970 — PESSÔA, S. B., SACCHETTA, L. e CAVALHEIRO, J. — Rev. Lat-Amer. Microbiol. *12*: 197-200.





FIGURAS 70-72




*Hepatozoon* da *Cyclagras gigas*

Figs. 70 e 71 — Formas sangüíneas.
Fig. 72 — Forma tissular (cisto esquizogônico).

22 — *Erythrolamprus aesculapii* ("falsa-coral"), figs. 73 e 74.

| | | | |
|---|---|---|---|
| Examinados ........................ | 34 | | |
| Parasitados por: *Hepatozoon* ......... | 13 | ... | 38% |

O *Hepatozoon* desta serpente foi descrito por Börner em 1901 (in Simond, 1901) que o denominou *Haemogregarina colubri.* Wenyon (1909) redescreveu-o e descreveu um tripanosoma, o *T. erythrolamprii.* Este flagelado não foi por nós encontrado nas serpentes desta espécie, que examinamos.

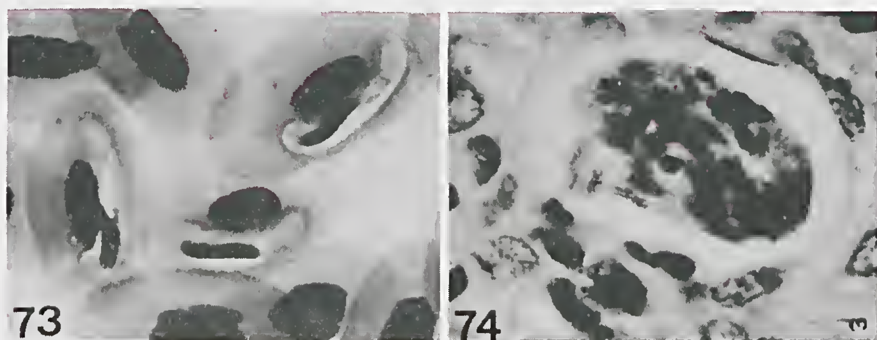
## BIBLIOGRAFIA

1901 — SIMOND, P. L. — Ann. Instit. Pasteur *15*: 319-351.

1908 — WENYON, C. M. — Parasitology *1*: 314-317.

1967 — PESSÔA, S.B. — Rev. Brasil. Biol. *27(2)*: 159-161.

FIGURAS 73 e 74




*Hepatozoon da Erythrolamprus aesculapii*

Fig. 73 — Forma sangüínea.

Fig. 74 — Forma tissular (cisto esquizogônico).

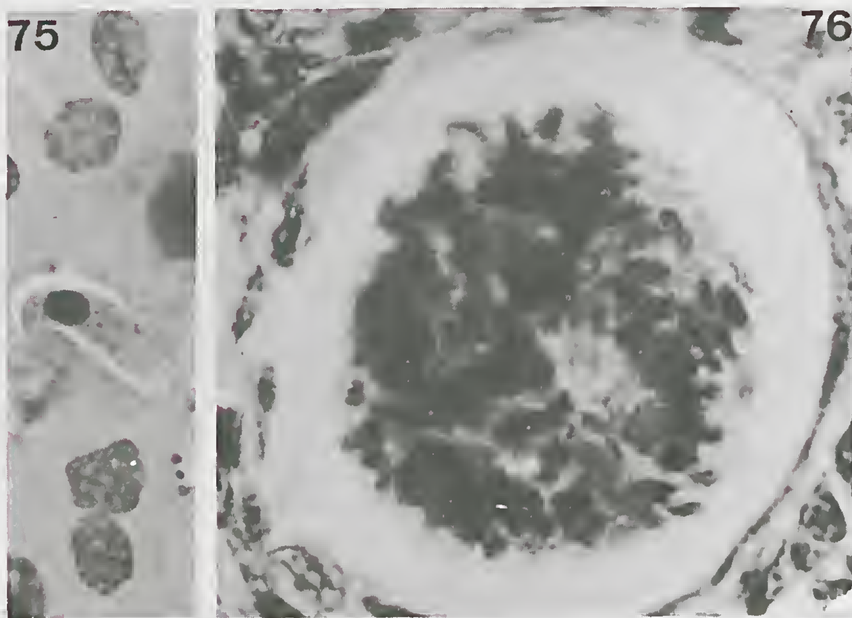
23 — *Helicops carinicaudus* ("cobra-d'água"), figs. 75 e 76.

Desta cobra examinamos somente 6 exemplares com dois positivos para *Hepatozoon*. Pessôa e Cavalheiro (1969) realizaram a evolução deste *Hepatozoon* que denominaram *Hepatozoon carinicauda,* na sanguessuga *Haementeria lutzi.*

BIBLIOGRAFIA

1969 — Rev. Goiana Med. *15*: 161-168.

FIGURAS 75 e 76




*Hepatozoon* da *Helicops carinicaudus*

Fig. 75 — Forma sangüínea livre.

Fig. 76 — Forma tissular (cisto esquizogônico).

24 — *Helicops modestus* ("cobra-d'água"), figs. 77 e 78.

| | |
|---|---|
| Examinados ........................ | 54 |
| Parasitados por: *Hepatozoon* ......... | 1 |

Dos exemplares examinados, desta espécie, mais comum que a precedente, só encontramos um parasitado por *Hepatozoon*, que foi denominado *Haemogregarina modesta*. Brumpt (1914) descreveu um tripanosoma nesta espécie, o *T. brazili*. Porém, no material que examinamos não tivemos ocasião de encontrar nenhum parasitado pelo tripanosoma descrito por Brumpt.

## BIBLIOGRAFIA

1914 — BRUMPT, E. — Bull. Soc. Path. Exot. *7*: 706-710.

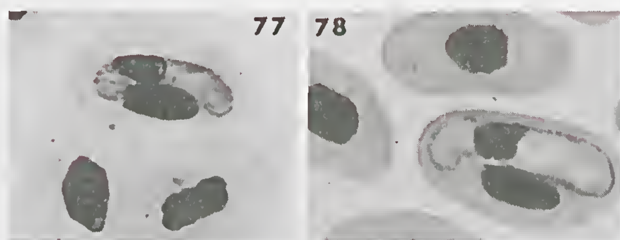
1928 — BRUMPT, E. — Précis de Parasitologie, 5.ª ed.

1942/1943 — LAVIER, G. — Ann. Parasit. Human et Comp. *19*: 168-169.

1969 — PESSÔA, S. B. e CAVALHEIRO, J. — Rev. Brasil. Biol. *29(3)*: 351-354.

1969 — PESSÔA, S. B. e CAVALHEIRO, J. — Rev. Goiana Med. *15*: 155-159.

FIGURAS 77 e 78




*Hepatozoon* da *Helicops modestus*

Figs. 77 e 78 — Formas sangüíneas.

PESSÔA, S. B., BIASI, P. & PUORTO, G. — Nota sobre a frequencia de hemoparasitas em serpentes do Brasil.
*Mem. Inst. Butantan, 38*: 69-118, 1974.

25 — *Leimadophis poecilogyrus* ("cobra-capim"), figs. 79 — 82.

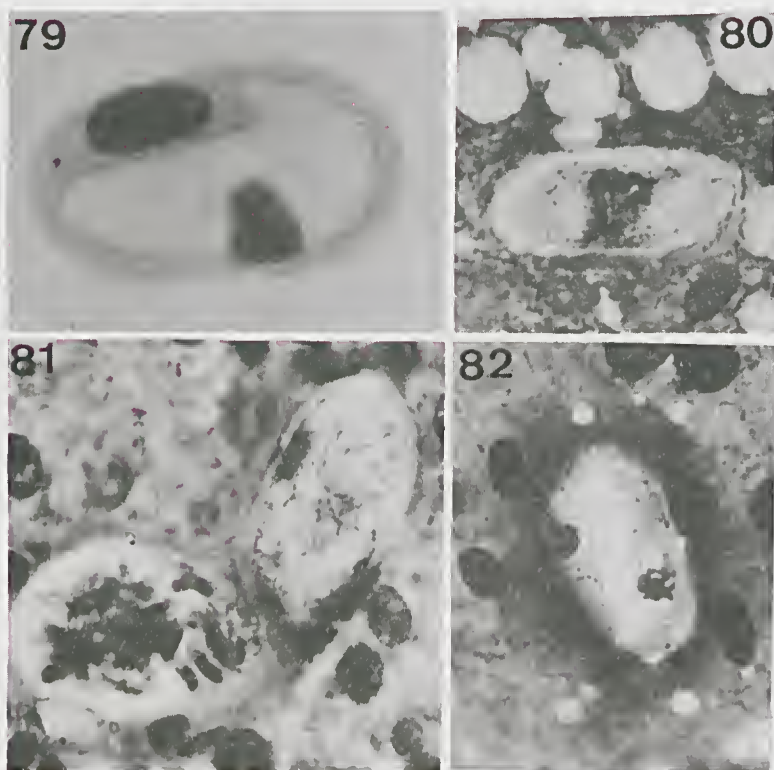
Examinados ........................ 55
Parasitados por: *Hepatozoon* ......... 6 .... 11%

*Hepatozoon* descrito por Pessôa (1967) sob o nome de *Haemogregarina leimadophisi*. Pessôa e Biasi (1974) obtiveram formas evolutivas jovens na *Haementeria gracilis*.

BIBLIOGRAFIA

1967 — PESSÔA, S. B. — Rev. Brasil. Biol. *27(1)*: 33-46.
1974 — PESSÔA S. B. e BIASI, P. — Rev. Pat. Trop. (*3*): 2, 221-224.

FIGURA 79-82




*Hepatozoon* da *Leimadophis poecylogirus*

Fig. 79 — Forma sangüínea (aumento × 2500).
Figs. 80-82 — Formas tissulares (cistos esquizogônicos).

26 — *Leimadophis typhlus*

| | | |
|---|---|---|
| Examinados ........................ | 9 | |

Todos os exemplares examinados foram negativos para hemoparasitas.

27 — *Liophis miliaris* ("cobra-d'água"), figs. 83 — 85.

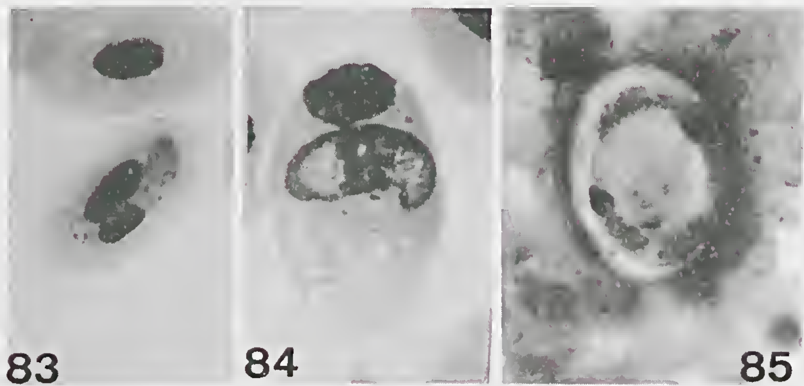
| | | | |
|---|---|---|---|
| Examinados | ........................ | 121 | |
| Parasitados por: | *Hepatozoon* ......... | 13 | ... 11% |
| | *Toddia* ............. | 1 | |

Este *Hepatozoon* foi descrito em 1968 por Pessôa que o denominou *Haemogregarina miliaris*. Em 1969, Pessôa e Cavalheiro realizaram a evolução desta espécie em sanguessuga *Haementeria lutzi*.

BIBLIOGRAFIA

1968 — PESSÔA, S. B. — Rev. Bras. Biol. *28(1)*: 71-76.
1969 — PESSÔA, S. B. e CAVALHEIRO, J. — Rev. Bras. Biol. *29(4)*: 451-458.

FIGURAS 83-85




*Hepatozoon* da *Liophis miliaris*

Figs. 83 e 84 — Formas sangüíneas.
Fig. 85 — Forma tissular, (cisto esquizogônico).

28 — *Liophis undulatus*
Examinados ........................ 7

Todos exemplares negativos para hemoparasitas.

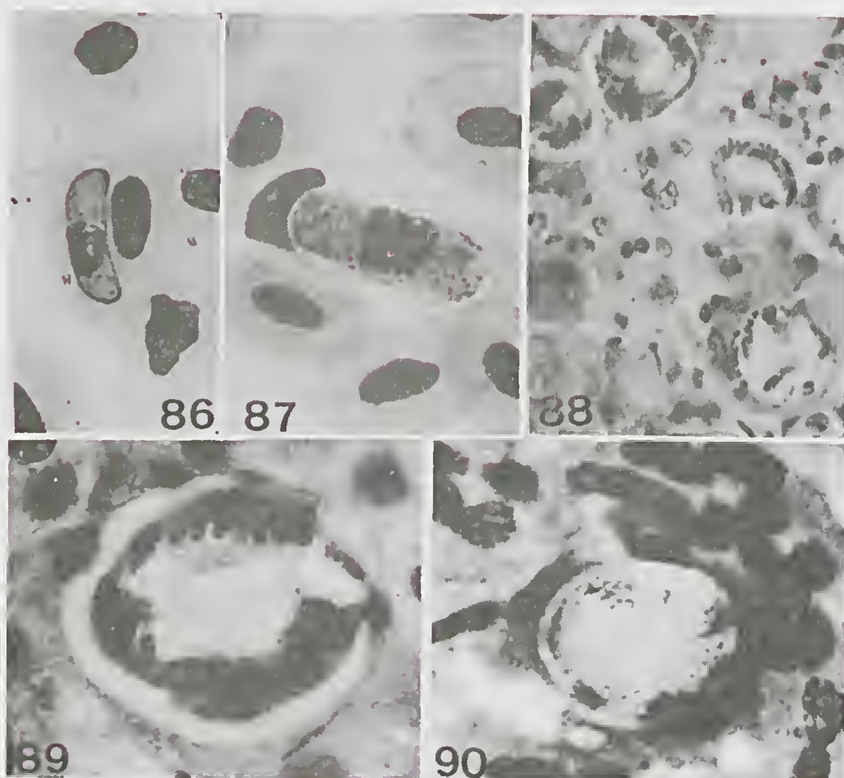
29 — *Mastigodryas bifossatus bifossatus* ("jararacussu do brejo"), figs. 86 — 90.
Examinados ........................ 42
Parasitados por: *Hepatozoon* ......... 10 ... 24%

O *Hepatozoon* desta serpente visto em 1901 por Lutz, foi descrito em 1912, numa cobra do Brasil, com o nome de *Haemogregarina drymobii* Marullaz, 1912.

BIBLIOGRAFIA

1912 — MARULLAZ, M. — C. R. Soc. Biol., Paris, *73*: 518-520.
1967 — PESSÔA, S. B. — Rev. Brasil. Biol. *27(1)*: 33-46.
1967 — PESSÔA, S. B. — Rev. Brasil. Biol. 27 (3): 333-335.

FIGURAS 86-90




*Hepatozoon* da *Mastigodryas bifossatus bifossatus*
Figs. 86 e 87 — Formas sangüíneas.
Figs. 88 - 90 — Formas tissulares (cistos esquizogônicos).

30 — *Oxyrhopus trigeminus* ("falsa-coral ou boicorá").
Examinados ........................ 38

Nos exemplares desta espécie que examinamos não encontramos hemoparasitas.

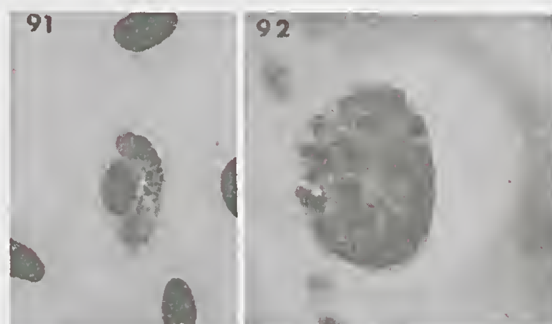
31 — *Philodryas aestivus* ("cobra-verde"), figs. 91 e 92.
Examinados ........................ 20
Parasitados por: *Hepatozoon* ......... 2 ... 10%

O *Hepatozoon* desta espécie foi descrito por Pessôa em 1928, com o nome de *Haemogregarina butantanensis* Pessôa, 1928.

BIBLIOGRAFIA

1928 — PESSÔA, S. B. — Rev. Biol. Hyg. *35*: 56-61.

FIGURAS 91 e 92




*Hepatozoon* da *Philodryas aestivus*

Fig. 91 — Forma sangüínea.
Fig. 92 — Forma tissular (cisto esquizogônico).

32 — *Philodryas nattereri*

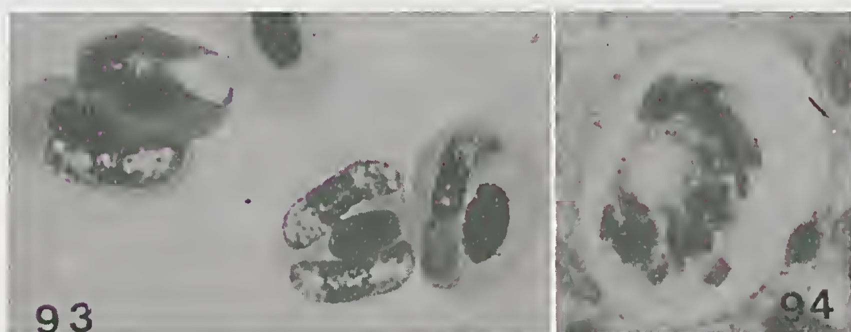
Examinado ........................ 1

O único exemplar examinado desta espécie encontrava-se positivo para *Hepatozoon*. Pessôa (1967) descreveu as formas tissulares (esquizogônicas) do *Hepatozoon* que Carini considerou como sendo *Haemogregarina philodryasi*. Pessôa (1928) descreveu nesta espécie um *Trypanosoma*, que denominou *T. philodriasi*.

BIBLIOGRAFIA

1928— PESSÔA, S. B. — Bol. Biológico, *13*: 81-82.
1967 — PESSÔA, S. B. — Rev. Bras. Biol. *27(1)*: 49-56.

FIGURAS 93 e 94




*Hepatozoon* da *Philodryas nattereri*

Fig. 93 — Forma sangüínea.
Fig. 94 — Forma tissular (cisto esquizogônico).

33 — *Philodryas olfersii* ("boiubú"), figs. 95 — 97.

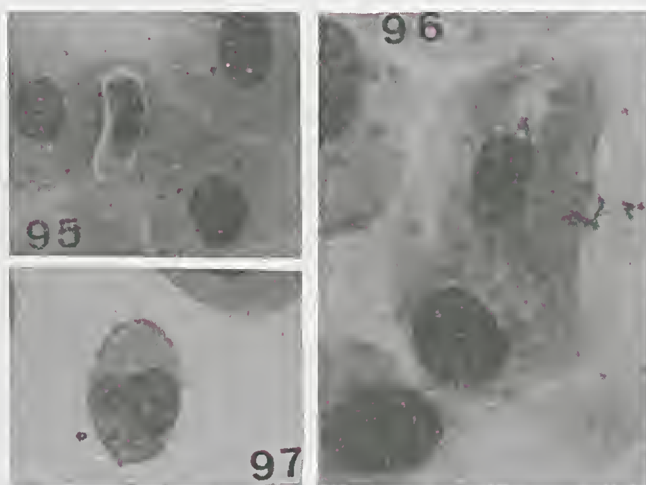
| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Examinados | ........................ | 37 | | |
| Parasitados por: *Hepatozoon* | ......... | 12 | ... | 32% |
| *Toddia* | ............ | 4 | ... | 10% |

O *Hepatozoon* desta espécie foi assinalado por Lutz (1901) e por Migone, no Paraguai (1916). A *Toddia* foi descrita em 1966, por Pessôa, que a denominou *Pyrhemocyton brazili.*

BIBLIOGRAFIA

1916 — MIGONE, L. E. — Bull. Soc. Path. Exot. *9*: 359-364.
1966 — PESSÔA, S. B. e CAMPOS, E. P. — Rev. Brasil. Biol. *26(4)*: 417-423.

FIGURAS 95-97




Hemoparasitas da *Philodryas olfersii*

Figs. 95 e 96 — Formas sangüíneas do *Hepatozoon.*
Fig. 97 — *Toddia.*

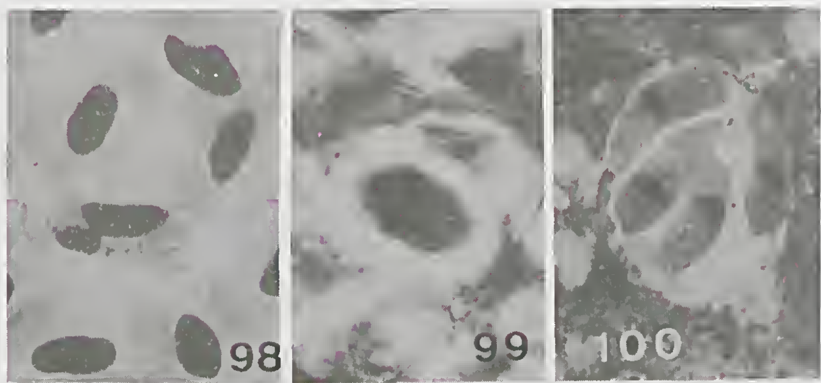
34 — *Philodryas patagoniensis* ("parelheira"), figs. 98-100.

| | | | |
|---|---|---|---|
| Examinados ........................ | 66 | | |
| Parasitados por: *Hepatozoon* ......... | 10 | ... | 15% |

BIBLIOGRAFIA

1901 — LUTZ, A. — Zentrlb. f. Bak. 1 Abd. *29*: 390-397.
1928 — PESSÔA, S. B. — Bol. Inst. Hyg. *35*: 56-61.

FIGURAS 98-100




*Hepatozoon* da *Philodryos patogoniensis*

Fig. 98 — Forma sangüínea.
Figs. 99 e 100 — Formas tissulares (cistos esquizogônicos).

35 — *Pseudoboa nigra*, figs. 101-105.

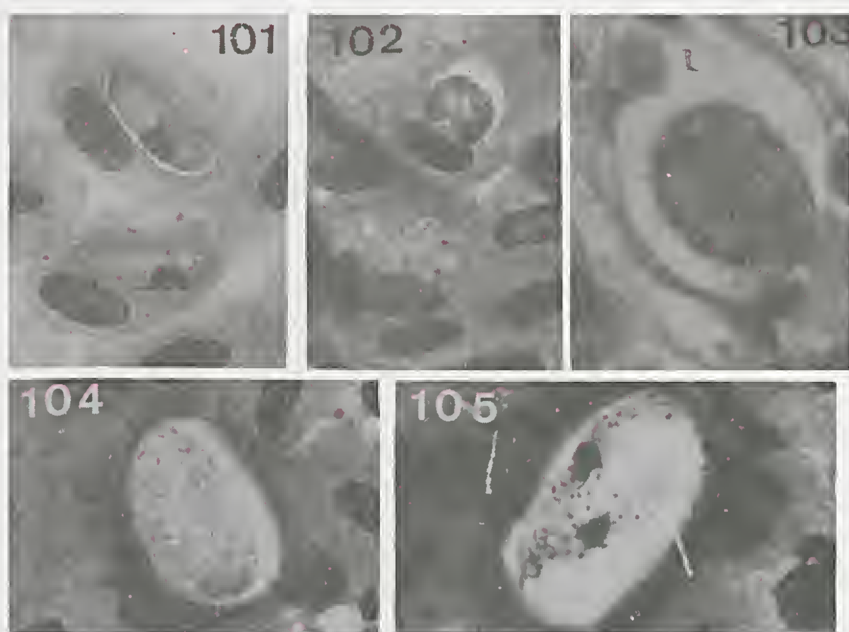
Examinado ........................ 1

Somente tivemos oportunidade de examinar um exemplar desta espécie, que se apresentava positivo para *Hepatozoon*. Pessôa (1967) descreve como *Haemogregarina pseudoboae*.

## BIBLIOGRAFIA

1967 — PESSÔA, S. B. — Rev. Bras. Biol. *27(1)*: 49-56.

## FIGURAS 101-105




*Hepatozoon* da *Pseudoboa nigra*

Fig. 101 — Forma sangüínea.

Figs. 102-105 — Formas tissulares (cistos esquizogônicos).

36 — *Rachidelus brazili* ("falsa-muçurana"), fig. 106

| | | | |
|---|---|---|---|
| Examinados ........................ | 21 | | |
| Parasitados por Trypanosoma ......... | 6 | ... | 28% |

Esta cobra também conhecida por falsa-muçurana, é interessante pelo fato de somente ter sido encontrada parasitada por uma espécie de *Trypanosoma,* que Pessôa (1968) descreveu sob o nome de *Trypanosoma hogei.*

BIBLIOGRAFIA

1968 — PESSÔA, S. B. — O Hospital *73(4)*: 265-270.

FIGURA 106




*Tripanosoma* da *Rachidelus brazili*

Fig. 106 — *Trypanosoma hogei.*

37 — *Sibynomorphus turgidus* ("dorme-dorme ou dormideira")

Desta espécie foram examinados quatro exemplares, todos negativos para hemoparasitas.

38 — *Simophis rhinostoma*

| | |
|---|---|
| *Examinados* ........................ | 17 |
| Parasitado por: *Hepatozoon* ......... | 1 |

39 — *Spilotes pullatus* ("caninana"), figs. 107-109.

| | |
|---|---|
| Examinados ........................ | 2 |
| Parasitado por: *Hepatozoon* ......... | 1 |

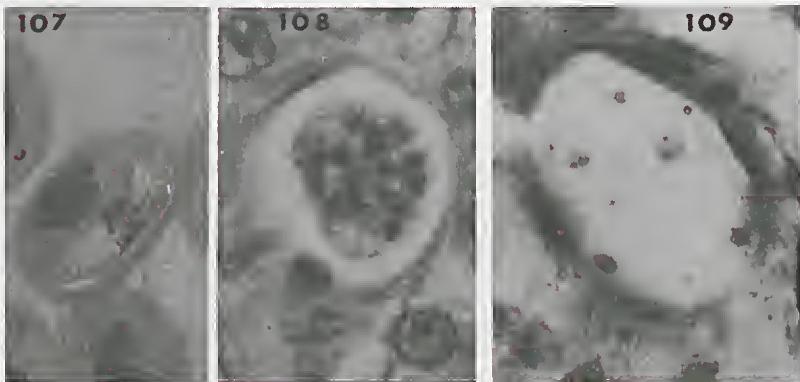
Lutz descreveu em 1901 como *H. serpentium* o hepatozoon desta espécie. Designação essa dada para todas as haemogregarinas das serpentes.

Pessôa (1968), descreve as formas sanguíneas e tissulares do *Hepatozoon* desta serpente, denominando o hemoparasita de *Haemogregarina pullatus*.

BIBLIOGRAFIA

1901 — LUTZ, A. — Ztbl. Bakt. Orig. *29*: 390-397.
1968 — PESSÔA, S. B. — Rev. Brasil. Biol. *28(1)*: 71-76.

FIGURAS 107-109




*Hepatozoon* da *Spilotes pullatus*

Fig. 107 — Forma sangüínea.
Figs. 108 e 109 — Formas tissulares (cistos esquizogônicos).

40 — *Thamnodynastes pallidus nattereri*, figs. 110 — 112.

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Examinados | ........................ | 30 | | |
| Parasitados por: | *Hepatozoon* ......... | 8 | ... | 27% |
| | *Haemogregarina pallida* ............... | 1 | | |

Nesta serpente encontramos a única espécie de hemoparasita do gênero *Haemogregarina* (sensu strictu) descrita em serpentes. Esta espécie foi descrita por Pessôa, Sacchetta e Cavalheiro (1971), nesta serpente do gênero *Thamnodynastes*, proveniente de Juiz de Fora MG, que denominaram o hemoparasita *Haemogregarina pallida.*

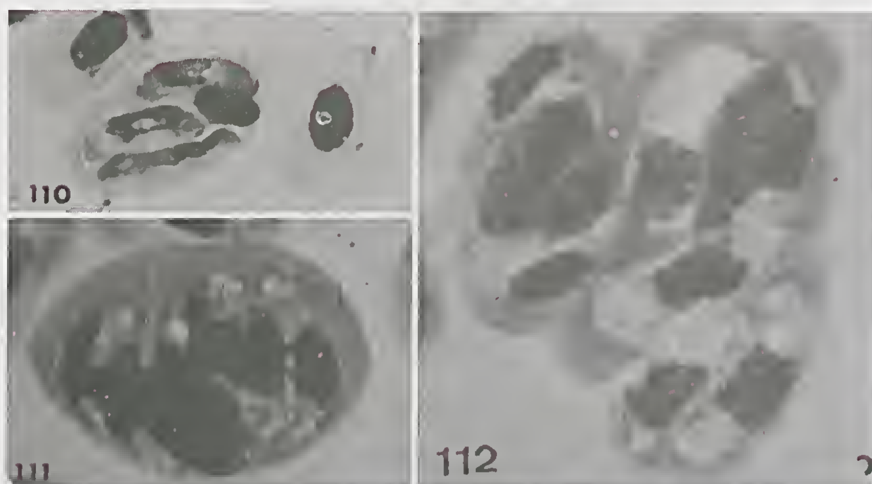
Garnham (1965) descreveu em *Thamnodynastes pallidus*, proveniente do Brasil, uma espécie de *Plasmodium*, que denominou *P. wenyoni.* Não encontramos nos 36 exemplares de *T. pallidus nattereri* por nós examinados espécies do gênero *Plasmodium.*

BIBLIOGRAFIA

1965 — GARNHAM, P. C. C. — Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. *59(3)*: 277-279

1971 — PESSÔA, S. A., SACCHETTA, L. & CAVALHEIRO, J. Rev. lat.-amer. Microbiol. *13*: 29-32.

FIGURAS 110-112




*Haemogregarina* e *Hepatozoon* da *T. pallidus nattereri*

Fig. 110 — Forma sangüínea do *Hepatozoon.*

Figs. 111 e 112 — Formas sangüíneas da *Haemogregarina* (s.s.)

41 — *Thamnodynastes strigatus* ("cobra-espada"), figs. 113 — 116.

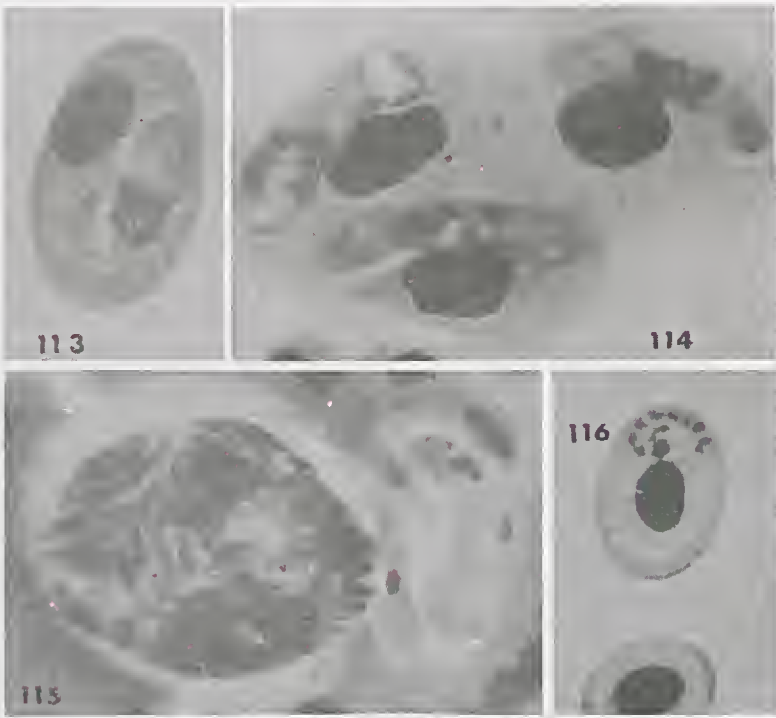
| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Examinados | ........................ | 192 | | |
| Parasitados por: | *Hepatozoon* ........ | 43 | ... | 22% |
| | *Plasmodium* e *Hepatozoon* ............. | 2 | | |
| | *Plasmodium* ........ | 1 | | |
| | *Toddia* ........... | 1 | | |

Pessôa (1967) descreveu a *Haemogregarina strigatus*, hepatozoon parasita desta serpente; o mesmo autor e cols. (1970) realizaram sua evolução no *Culex dolosus* e *C. fatigans*.

BIBLIOGRAFIA

1967 — PESSÔA, S. B. — Rev. Bras. Biol. *27(1)*: 49-56.
1970 — PESSÔA, S. B., CAVALHEIRO, J. e SOUZA, D. M. — Arq. Instit. Biológico, S. Paulo, *37(3)*: 213-217.

FIGURAS 113-116




Hemoparasitas da *Thamnodynastes strigatus*

Figs. 113 e 114 — Formas sangüíneas do *Hepatozoon*.
Fig. 115 — Forma tissular (cisto esquizogônico) do *Hepatozoon*.
Fig. 116 — Esquizonte em divisão, do *Plasmodium*.

42 — *Tomodon dorsatus* ("cobra espada"), figs. 117-119.

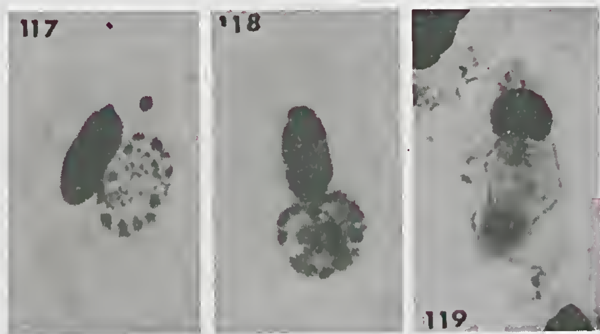
| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Examinados | | 179 | | |
| Parasitados por: | *Hepatozoon* | 7 | ... | 4% |
| | *Plasmodium* | 2 | ... | 1% |
| | *Toddia* | 7 | ... | 4% |

O *Plasmódium* da *T. dorsatus* foi descrito por Pessôa e Fleury (1968) sob o nome de *Plasmodium tomodoni*. A *Toddia* foi descrita por Pessôa em 1967, como *T. tomodoni*.

BIBLIOGRAFIA

1967 — PESSÔA, S. B. — Rev. Brasil. Biol. *27(4)*: 391-394.
1968 — PESSÔA, S. B. e FLEURY, G. C. — Rev. Brasil. Biol. *28(4)*: 525-530.

FIGURAS 117-119




Hemoparasitas da *Tomodon dorsatus*

Figs. 117 e 118 — Esquizontes em divisão do *Plasmodium tomodoni*.
Fig. 119 — *Toddia*.

43 — *Xenodon guentheri*

Examinados ........................ 10

Todos os exemplares desta espécie encontravam-se negativos para hemoparasitas.

44 — *Xenodon merremii* ("boipeva"), figs. 120-123.

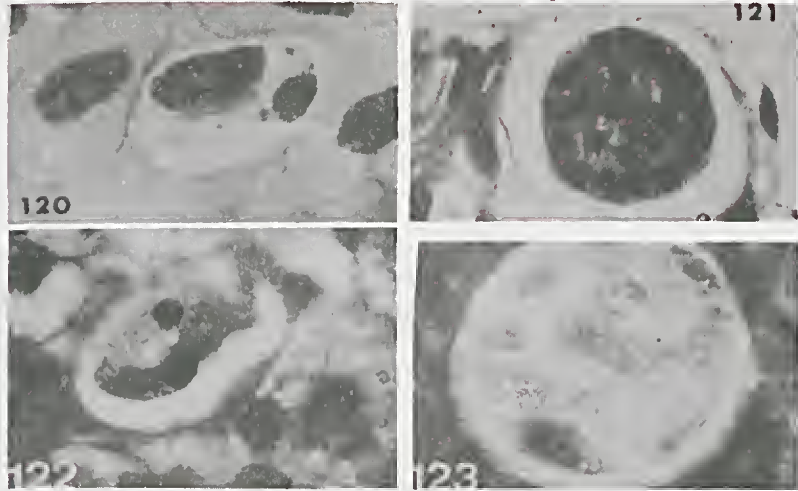
| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Examinados | ........................ | 146 | | |
| Parasitados por: | *Hepatozoon* ......... | 8 | ... | 5% |
| | *Trypanosoma* ...... | 1 | | |

O *Hepatozoon* desta espécie foi descrito sob o nome de *Haemogregarina butantanensi* por Arantes em 1931; como o nome estivesse preocupado (*H. butantanensi* Pessôa, 1928, da *Philodryas aestivus*), Pessôa propôs denominá-la *H. arantesi*. Os tripanosomas parasitas desta espécie foram descritos por Arantes e Fonseca em 1931, com o nome de *Trypanosoma butantanensis* e *T. merremii.*

BIBLIOGRAFIA

1931 — ARANTES, J. B. — Mem. Instit. Butantan *6*: 237-239.
1931 — ARANTES, J. B. e FONSECA, F. — Mem. Instit. Butantan *6*: 215-222.
1931 — ARANTES, J. B. e FONSECA, F. — Mem. Instit. Butantan *6*: 227-229.
1967 — PESSÔA, S. B. — Rev. Brasil. Biol. *27(1)*: 36.

FIGURAS 120-123




*Hepatozoon da Xenodon merremii*

Fig. 120 — Forma sangüínea.
Figs. 121-123 — Formas tissulares (cistos esquizogônicos).

45 — *Xenodon neuwiedii* ("quiriripitá").

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Examinados | | 30 | | |
| Parasitados por: | *Hepatozoon* ........ | 3 | ... | 10% |
| | *Trypanosoma* ...... | 1 | | |

O *Hepatozoon* desta espécie foi descrito por Lutz em 1901.

Consideramos o *Trypanosoma* desta espécie idêntico a *T. butantanensis* Arantes e Fonseca, 1931.

BIBLIOGRAFIA

1901 — LUTZ, A. — Zentrlb. f. Bak. 1 Abd. 29: 390-397.

1931 — ARANTES, J. B. — Mem. Instit. Butantan *6*: 237-239.

1931 — ARANTES, J. B. e FONSECA, F. — Mem. Instit. Butantan *6*: 215-229.

## RESUMO E CONCLUSõES

Considerando-se os dados estatísticos publicados neste trabalho, sobre os hemoparasitas dos ofídios brasileiros, pode-se ver, em primeiro lugar, que eles são parasitados pelos protozoários dos seguintes gêneros: *Hepatozoon, Haemogregarina* (s.s.), *Plasmodium, Trypanosoma,* e *Toddia.* Devemos assinalar entretanto a provável natureza virótica do último gênero.

Em segundo lugar verifica-se que os mais freqüentes destes hemoparasitas são os do gênero *Hepatozoon* e o menos freqüente pertence ao gênero *Haemogregarina* (sensu strictu). Com efeito, enquanto os primeiros parasitam até 70% dos exemplares de certas espécies de serpentes (por exemplo 71% das *Cyclagras gigas*), a *Haemogregarina* (s.s.) *pallida* foi encontrada em um único exemplar da *Thamnodynastes pallidus nattereri.* Em certas espécies não encontramos hemoparasitas, como por exemplo, nas espécies de serpentes do gênero *Micrurus* (*M. corallinus* e *M. lemniscatus*), do qual examinamos, é verdade, poucos exemplares. Também não encontramos hemoparasitas na *Bothrops insularis,* espécie restrita à Ilha da Queimada Grande, SP. Em relação aos outros gêneros de hemoparasitas, assinalamos a freqüência relativamente grande com que encontramos a *Bothrops moojeni* parasitada por espécies do gênero *Plasmodium,* que alcançou 8% de 164 exemplares examinados. As espécies do gênero *Trypanosoma* foram encontradas também em certas cobras, com muita freqüência, como na *Rachidelus brazili* (28% de 21 exemplares examinados) e 14% das *Boa constrictor.*

Finalmente, o gênero *Toddia* (que é provavelmente vírus), encontramos espécies de alguns gêneros de serpentes fortemente parasitadas, como a *Bothrops pradoi* e a *Philodryas olfersii,* ambas com 10% de exemplares positivos; as demais espécies eram negativas ou com baixo parasitismo,





de 1 a 2%. Não pudemos ainda chegar a qualquer conclusão sobre o mecanismo de transmissão destes parasitas sangüíneos.

Em relação aos *Hepatozoon* sabemos que são transmitidos por mosquitos, flebótomos, carrapatos e sanguessugas. Também conseguimos a infecção de mosquitos pela *Haemogregarina pallida*, mas em relação aos gêneros *Trypanosoma* e *Plasmodium* ainda não foi conseguida a elucidação do mecanismo completo de sua transmissão. Ayala, em vários trabalhos conseguiu demonstrar a infecção de *Phlebotomus* por espécies destes gêneros, parasitas de lagartixa; nós não tivemos a oportunidade de experimentar a transmissão do *Plasmodium* por intermédio de *Phlebotomus*, porém experiências com mosquitos foram sempre negativas; conseguimos entretanto a evolução de espécie de *Trypanosoma* de serpentes aquáticas em sanguessugas, fato aliás demonstrado há muito tempo por Brumpt. Quanto aos Tripanosomas nas espécies terrestres ou arborícolas das serpentes a transmissão parece processar-se por meio de mosquitos.

De qualquer forma, devemos levar em consideração também a transmissão congênita destes parasitas, como já demonstramos a sua possibilidade no que se refere aos hepatozoons (Biasi e cols.). Tais estudos porém, são difíceis de serem feitos, pois, dependem da criação de serpentes e do encontro de serpentes prenhes e parasitadas.

Finalmente devemos notar que não encontramos aparentemente diferenças no parasitismo de serpentes vivíparas e ovíparas.

*SUMMARY* — The authors report the results of a research on hemoparasites found in the blood of more than 2,000 snakes pertaining to 24 genera and 45 species, venomous or not, captured mainly in the center-south region of Brazil. It has been verified that the following genera of blood protozoans parasitize the brazilian snakes: *Hepatozoon*, *Haemogregarina* (s. s.), *Plasmodium*, *Trypanosoma* and *Toddia*. The majority of these hemoparasites belong to the genus *Hepatozoon*, parasitizing up to 70% of certain species as for instance *Cyclagras gigas*; less frequent is *Haemogregarina pallida*, the only species of the genus *Haemogregarina* (s. s.), found only once in the blood of one single specimen of *Thamnodynastes pallidus nattereri*.

No hemoparasites at all were found in certain species (in snakes of the genus *Micrurus*, and *Bothrops insularis*). Species of the genus *Trypanosoma* were found with great frequency in several snake species, as for instance *Rachidelus brazili* (in 28% of the 21 specimens examined). As regards the genus *Plasmodium*, few snakes are parasitized, however, about 8% of some species, as *Bothrops moojeni*, were found to be infected among the 164 specimens examined. Finally, there are some snake species, as *Bothrops pradoi* and *Philodryas olfersii* markedly parasitized (11%) by the genus *Toddia* (probably a "virus").

No microfilaria were found in the blood of snakes.

*UNITERMS* — Hemoparasite frequency, Serpentes; Blood; *Plasmodium*; *Hepatozoon*; *Typanosoma*; *Haemogregarina* (s.s.); *Toddia*; Microfilária.

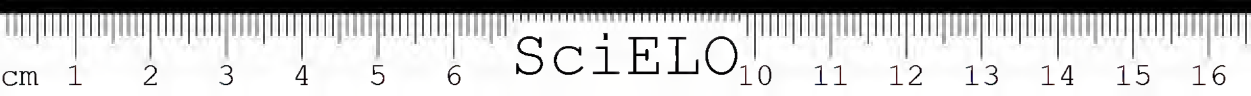
Recebido para publicação em 30-V-1974 e aceito em 10-X-1974.

1906 — BRUMPT, E. — C. R. Soc. Biol. *60*: 162.

1970 — AYALA, S. C. — Jour. Parasitol. *56*: 387-388.

1971 — AYALA, S. C. — Jour. Parasitol. *57*: 598-602.

1972 — BIASI, P., PESSÔA, S. B. e BELLUOMINI, H. F. — Atas Soc. Biologia do Rio de Janeiro *15(1)*: 27, 28.


cm 1 2 3 4 5 6
SciELO
10 11 12 13 14 15 16

Mem. Inst. Butantan
38: 119-122, 1974

# EVOLUÇÃO DO *HEPATOZOON* SP. PARASITA DO *LEPTOPHIS AHAETULLA* (LINEU) (SERPENTES, COLUBRIDAE) NO *CULEX FATIGANS* *

SAMUEL B. PESSÔA**
PERSIO DE BIASI**
LIA SACCHETTA***

*RESUMO* — Mosquitos *Culex fatigans* picaram uma serpente não peçonhenta — *Leptophis ahaetulla*, parasitada por espécies dos gêneros *Plasmodium* e *Hepatozoon*. O *Hepatozoon sp.* desenvolveu-se regularmente nos mosquitos, formando esporozoítas no fim de 15 dias; não houve nenhum desenvolvimento do *Plasmodium sp.*

*UNITERMOS* — *Hepatozoon*; Hemoparasitas de serpentes; Hirudinea; Evolução do Hepatozoon.

## INTRODUÇÃO

Em setembro de 1973, examinamos uma serpente não peçonhenta, *Leptophis ahaetulla* (Lineu) capturada em Promissão, SP e verificamos estar o ofídio parasitado por plasmódio e por hepatozoon (figs. 1 a 3).

Há muito tempo vimos tentando conseguir a evolução de plasmódios de serpentes em mosquitos. Já tivemos a oportunidade de experimentar várias espécies de mosquitos, não só dos gêneros *Culex* e *Aedes*, como do gênero *Anopheles* (p. ex. o *A. darlingi*), sempre com resultados negativos.

Como raramente temos encontrado serpentes parasitadas simultaneamente por espécie do gênero *Plasmodium* e do gênero *Hepatozoon*, aproveitamos a oportunidade para tentar a evolução dos parasitas destes dois gêneros em mosquito, havendo a possibilidade de se ficar conhecendo as formas evolutivas de ambos os hemoparasitas (plasmódio e hepatozoon) ou de apenas um deles, que parasitavam a *Leptophis ahaetulla*, ainda não descritos. Realmente, ocorreu a segunda possibilidade, pois obtivemos unicamente as formas evolutivas do *Hepatozoon* sp., parasita daquela serpente.

## MATERIAL E MÉTODOS

O mosquito usado foi o *Culex fatigans*, criado em laboratório. A serpente foi colocada na gaiola que continha cerca de 50 fêmeas do *Culex fatigans*, nas noites de 26/27 e 27/28 de novembro. As técnicas usadas em tais experiências foram descritas em outros trabalhos nossos[1], assim como a manutenção dos mosquitos em gaiolas até a maturação dos oocistos e formação dos esporozoítas.

* Trabalho feito com o auxílio do Fundo de Pesquisas do Instituto Butantan.
** Do Instituto Butantan.
*** Do Instituto Adolfo Lutz.

Endereço para correspondência:
C.P. 65 — 05504 — S. Paulo — Brasil.

Quanto aos parasitas, *Plasmodium* sp. e *Hepatozoon* sp. como já dissemos, não foram ainda descritos. O *Plasmodium* sp. apresenta rosáceas com 25-31 células filhas que têm a tendência de se colocar nos pólos dos glóbulos vermelhos (fig. 1). Não nos alongamos nas considerações deste parasita, pois estamos preparando um estudo mais amplo sobre os plasmódios das serpentes brasileiras. O *Hepatozoon* sp. apresenta gametócitos alongados e em alguns exemplares o núcleo também se mostrava muito alongado (figs. 2 e 3). O parasita não altera nem desloca o núcleo do glóbulo. Mede cerca de 20 microns de comprimento por 2 a 2,5 microns de largura.

## RESULTADOS OBTIDOS

Dez dias após picarem a serpente, dois mosquitos foram dissecados, com resultados negativos (7/12/73). Cinco dias depois (12/12/73) e por conseguinte 15 dias após a picada e sucção do sangue da serpente, dissecando outros exemplares encontramos vários parasitados pelo hepatozoon, mas todos negativos para plasmódio. Alguns dos mosquitos apresentavam várias dezenas de cistos de hepatozoon, mas sempre negativos para o plasmódio. Na figura 4 damos uma microfoto de alguns destes cistos com aumento pequeno. Na figura 5, com aumento maior (500x) pode-se ver os cistos abarrotados de esporocistos; na figura 6 (com imersão), já se podem ver os cistos cheios de esporocistos com os esporozoítas completamente formados.

Os oocistos jovens medem 100 a 150 microns; os maduros de 150 a 200 microns e os esporocistos de 30 a 45 microns, e no seu interior um número de esporozoítas muito variável, de 25, 30 até 45 organismos para cada esporocisto.

Durante os 15 dias da evolução experimental do *Hepatozoon* parasita da *Leptophis ahaetulla* a temperatura oscilou entre 25°C a 30°C e a umidade relativa entre 78 a 82%.

Alguns mosquitos infectados foram triturados em solução fisiológica e administrados por sonda gástrica a dois filhotes de *Bothrops pradoi* ("jararaca"), que permaneceram negativos.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Sr. Joaquim Cavalheiro, do Instituto Butantan, que capturou a *Leptophis ahaetulla* e fez a manutenção do exemplar em cativeiro; ao Sr. Francisco C. Vieira, do Instituto Adolfo Lutz que cuidou da criação dos mosquitos.

*SUMMARY* — Mosquitoes *Culex fatigans* were induced to bite a non poisonous snake, *Leptophis ahaetulla* infested with parasites of both genera *Plasmodium* and *Hepatozoon*.

*Hepatozoon* sp. developed normally in the mosquitoes, forming sporozoites at the end of 15 days, however, no development of any *Plasmodium* sp. could be detected.

*UNITERMS* — *Hepatozoon;* Hemoparasites of serpentes; Hirudinea; *Hepatozoon* evolution.

PESSÔA, S. B., BIASI, P. & SACCHETTA, L. — Evolução do *Hepatozoon* sp. parasita do *Leptophis ahaetulla* (Lineu) (Serpentes — Colubridae) no *Culex fatigans*.
*Mem. Inst. Butantan*, *39*: 119-122, 1974.

## BIBLIOGRAFIA

PESSÔA, S. B. BELLUOMINI, H. E., BIASI, P. e SOUZA M. (1971). Notas sobre hemogregarinas de serpentes brasileiras XIV — Esporogonia da hemogregarina de *Bothrops moojeni* Hoge, 1963 no *Culex dolusus* (L. Arribalzaga, 1891).
*Arquivos Inst. Biológico*, S. Paulo, 38(4): 253-258.

Recebido para publicação em 30-V-1974 e aceito em 10-X-1974.

## DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Fig. 1 — *Plasmodium sp.* parasitando a *Leptophis ahaetulla*. (Aumento 2000 X)

Fig 2 — *Hepatozoon sp.* e *Plasmodium sp.* no sangue da *L. ahaetulla*. Focalizados no mesmo campo microscópico. (Aumento 2000 X)

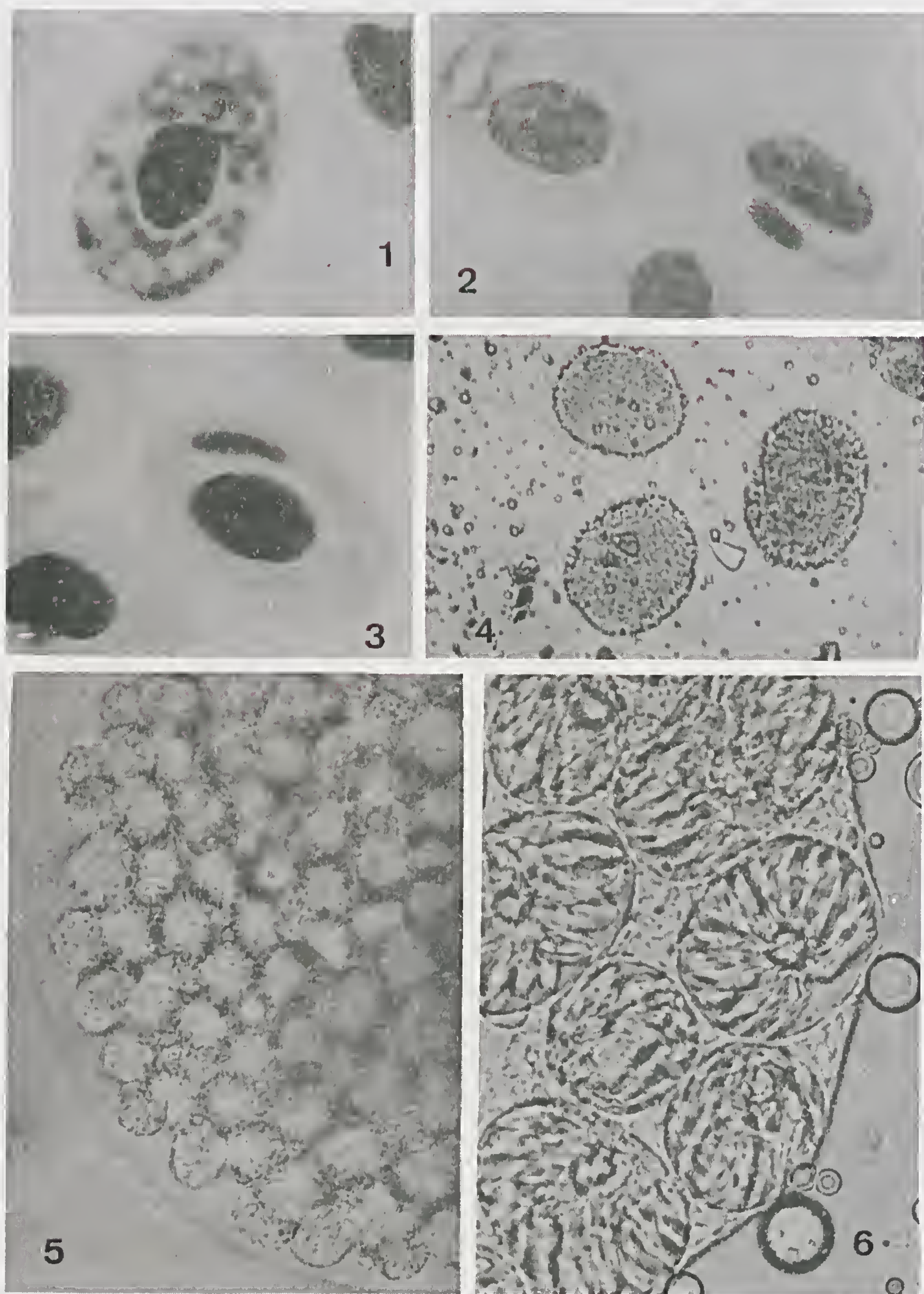
F ig. 3 — *Hepatozoon sp.* parasitando a *L. ahaetulla*. (Aumento 2000 X)

Fig. 4 — Oocistos jovens de *Hepatozoon sp.* (da *L. ahaetulla*) na cavidade geral do *Culex fatigans*. (Aumento 100 X)

Fig. 5 — Oocisto, com grande número de esporocistos na cavidade geral do *Culex fatigans* que sugou a serpente *L. ahaetulla*. (Aumento 500 X)

Fig. 6 — Esporocistos de *Hepatozoon sp.* de *L. ahaetulla* cheios de esporozoítas ainda no interior do oocisto. (Aumento 1000 X)

PESSÔA, S. B., BIASI, P. & SACCHETTA, L. — Evolução do *Hepatozoon* sp. parasita do *Leptophis ahaetulla* (Lineu) (Serpentes — Colubridae) no *Culex fatigans*.
*Mem. Inst. Butantan, 39*: 119-122, 1974.



*Mem. Inst. Butantan*
*38*: 1283-130, 1974

# NOTA SOBRE O *HEPATOZOON TUPINAMBIS* (LAVERAN E SALIBENI, 1909) (*PROTOZOA, APICOMPLEXA*), *PARASITA* DO TEJÚ (*TUPINAMBIS TEGUIXIN* LINEU, 1758) (*SAURIA, TEIIDAE*)*

SAMUEL B. PESSÔA**
PERSIO DE BIASI**
LIA SACCHETTA***

*RESUMO* — Os autores examinaram 40 tejús (*Tupinambis teguixin*) de várias localidades brasileiras, tendo encontrado 9 deles parasitados por *Hepatozoon* spp. Em 3 tejús do Ceará e em 3 de São Paulo o parasita foi identificado como sendo o *Hepatozoon tupinambis* (Laveran e Salibeni, 1909), não sendo identificados os parasitas dos outros 3 lagartos, 2 de Santa Catarina e 1 do Rio de Janeiro. Descrevem as formas esquizogônicas e a evolução do hepatozoon em mosquitos (*Culex fatigans*). Somente conseguiram a evolução do *H. tupinambis* parasita dos lagartos de São Paulo (Ilha Solteira); não conseguiram a evolução daqueles que parasitam o *T. teguixin* do Ceará. Pretendem estudar futuramente a causa desta diferença.

*UNITERMOS* — Hemoparasita de Sauria; *Hepatozoon tupinambis;* Evolução do *Hepatozoon.*

## INTRODUÇÃO

Laveran e Salibeni, apresentaram em 18 de janeiro de 1909 à Academia de Ciências da França[5], a descrição de uma espécie nova de hemogregarina parasita do *Tupinambis teguixin,*[1] da Ilha do Governador (Guanabara, Brasil), vulgarmente denominada "tejú" ou "teiú". Denominaram este parasita *Haemogregarina tupinambis.* Dez dias depois, Carini[2], na Sociedade Científica de São Paulo, leu a descrição de duas novas espécies de hemogregarinas, parasitas do *Tupinambis teguixin,* capturado nos arredores de São Paulo, e as denominou *H. tupinambisi* e *H. missoni.* Laveran[4] após examinar os preparados de Carini concluiu que a *H. tupinambis* Laveran e Salibeni era diferente da *H. tupinambisi* Carini e propôs que esta última espécie fosse denominada de *H. caranii* Laveran, 1909. Quanto à segunda espécie de Carini, Laveran sugeriu tratar-se de forma jovem da *H. carinii* (= *H. tupinambisi*).

Em 1914 Ducceschi[3] descreveu uma nova espécie de hemogregarina, parasita do *T. teguixin,* que denominou *H. iguanae.* Também Plimmer em 1912[10] e Migone[7] em 1916 assinalaram a presença de hemogregarinas no tejú.

Talice, em 1929[12] foi o primeiro autor a descrever um esporozoário parasita de um Triatomíneo, pois encontrou grandes cistos de um espo-

* Trabalho do Instituto Butantan, São Paulo, feito com o auxílio do Fundo de Pesquisas deste Instituto.
** Do Instituto Butantan, São Paulo.
*** Do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo.

(1) A designação genérica do lagarto é a do "Catalogue of Neotropical Squamata; Part II. Lizards and Amphisbaenians" — James A. Peters e Roberto Donoso — Barros; Smithsonian Institution United States National Museum. *Washington, 1970.*

Endereço para correspondência:
C.P. 65 — 05504 — São Paulo — Brasil.

PESSÔA, S. B., BIASI, P. & SACCHETTA, L. — Notas sobre o *Hepatozoon tupinambis* (Laveran e Salibeni, 1909) (Protozoa, Apicomplexa), parasita do Teju (*Tupinambis teguixin* Lineu, 1758) (Sauria, Teiidae).

*Mem. Inst. Butantan*, 38: 123-130, 1974.

rozoário e esporozoítas livres na parede intestinal do *Triatoma rubrovaria*. Considerou estes cistos como formas evolutivas de uma hemogregarina que, possivelmente, teria um lagarto como hospedeiro vertebrado. Posteriormente Osimani[8] descreveu outro esporozoário parasita do *Tupinambis teguixin*, que considerou, provavelmente, transmitido pelo *Triatoma rubrovaria*. Denominou-o *Haemogregarina triatomae*, que foi colocado no gênero *Hepatozoon* por Reichenow[11] em 1953.

Bice[1] em 1965 encontrou um *Hepatozoon* em 9 exemplares de 451 *Triatoma rubida uhleri* do Arizona (E.U.A.). Este autor, após discutir a possibilidade deste parasita ser idêntico ao *Hepatozoon triatomae* (Osimani, 1942) Reichenow, 1953, emitiu a hipótese de ser uma lagartixa o *Sceloporus magister*, o hospedeiro vertebrado do esporozoário.

Finalmente, não podemos deixar de referir que, em 1917, Leger e Mauzels[6] descreveram, no *Tupinambis nigropunctatus*, a *Haemogregarina weinbergi* que, segundo os seus descobridores, parasita unicamente os glóbulos brancos do lagarto. Não vimos mais referências, na literatura por nós consultada, sobre esta espécie, e nós mesmos não a encontramos no único exemplar de *Tupinambis nigropunctatus* por nós examinado e proveniente da lha Solteira (São Paulo).

## II — MATERIAL E MÉTODOS

Examinamos esfregaços de sangue fixados pelo metanol e corados pelo Giemsa. Foram feitos, também, exames histológicos de cortes de tecidos de dois tejús parasitados, bem como esfregaços dos tecidos corados pelo Giemsa. Os cortes eram corados pela hematoxilina-eosina. Tivemos oportunidade de examinar 40 exemplares de *Tupinambis teguixin*, de várias procedências; estes lagartos foram coletados desde 1967 até 1973, conforme demonstramos no quadro I.

As técnicas para tentativas de infecção experimental por meio de mosquitos já foram dadas em outros trabalhos dos autores[9]. As técnicas para tentativa de infecção de "barbeiros" (triatomíneos), também já foram ali descritas.

QUADRO I

Número de *Tupinambis teguixin* examinados, com a procedência, e resultados obtidos

| Procedência | Examinados | Positivos para hepatozoon |
|---|---|---|
| São Paulo — Ilha Solteira | 10 | 3 |
| Paraná | 2 | 0 |
| Rio de Janeiro | 1 | 1 |
| Santa Catarina | 2 | 2 |
| Ceará | 7 | 3 |
| Mato Grosso | 1 | 0 |
| Outras localidades | 11 | 0 |
| Procedência desconhecida | 6 | 0 |
| TOTAL | 40 | 9 |





## III — RESULTADOS OBTIDOS

O quadro I registra os Estados donde foram recebidos os lagartos, o número de positivos e de negativos para *Hepatozoon* em geral. Como vemos por ele, tivemos a oportunidade de examinar 40 exemplares de *T. teguixin* de 6 Estados, tendo encontrado 9 lagartos parasitados por espécies do gênero *Hepatozoon*.

*Os parasitas* — Como vimos foram descritas cinco espécies de *Hepatozoon* parasitas do *Tupinambis teguixin*:

*H. tupinambis* (Laveran e Salibeni, 1909)
*H. missoni* (Carini, 1909)
*H. carinii* (Laveran, 1909)
*H. iguanae* (Ducceschi, 1914)
*H. triatomae* (Osimani, 1932)

Nós somente conseguimos identificar uma única espécie de *Hepatozoon*, nos lagartos por nós examinados, o *Hepatozoon tupinambis* (Laveran e Salibeni, 1909), que parasitava tejús provenientes de São Paulo (Ilha Solteira) e do Ceará (Fortaleza).

Além destes 6 lagartos parasitados pelo *H. tupinambis* encontramos três outros, um do Estado do Rio de Janeiro e dois do Estado de Santa Catarina, parasitados por espécies de hepatozoons que não conseguimos determinar (Figs. 1 e 2), e que nos parece, são, provavelmente, parasitas de lagartixas que invadiram os tejús, como lembrou Bice, para o caso do *H. triatomae*.

### *HEPATOZOON TUPINAMBIS* (LAVERAN E SALIBENI, 1909) (Figs. 3-6)

sin : *Haemogregarina tupinambis* Laveran e Salibeni, 1909
" : *Haemogregarina carinii* Laveran, 1909
" : *Haemogregarina tupinambisi* Carini, 1909

*Distribuição geográfica* — Estado da Guanabara (Laveran e Salibeni, 1909); São Paulo, Capital (Carini, 1909). Nós encontramos esta espécie parasitando tejús de S. Paulo (Ilha Solteira) e do Estado do Ceará, que nos foram enviados pelo Prof. Livino V. Pinheiro da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

*Descrição* — A descrição desta espécie foi excelentemente feita por Laveran e Salibeni e por Carini, em 1909 e posteriormente, no mesmo ano, novamente por Laveran. Pensamos não ser necessário repisar o que já foi tão bem registrado. Laveran e Salibeni, no ano citado, também deram boas figuras do parasita.

Faremos aqui somente anotações sobre certos pontos que nos parecem mais interessantes. Assim o parasita determina alterações pro-

fundas sobre o glóbulo vermelho parasitado; o núcleo do glóbulo pode ser deslocado, torna-se delgado e alongado (Fig. 4) e muitas vezes é dividido em duas porções, que se colocam nos dois polos celulares (Fig. 5). Muitas vezes determina o *Hepatozoon* grande hipertrofia do glóbulo (Fig. 6) que chega a alcançar 36 a 37 micras de comprimento por 12 a 13 micras de largura; a sua coloração torna-se muito pálida. Nas várias microfotografias que apresentamos pode-se ver uma cápsula que envolve o parasita.

*Formas esquizogônicas tissulares* — Não tinham sido até hoje descritas as formas esquizogônicas tissulares do *H. tupinambis*. Nós as encontramos no fígado e pulmão, mais freqüentemente, porém, no primeiro daqueles órgãos. Examinamos também a medula óssea e a mucosa intestinal, sem conseguir assinalá-los.

Na Fig. 7 damos a microfotografia de um corte de pulmão, com cisto esquizogônico do *Hepatozoon tupinambis*, do tejú de Fortaleza (Ceará). (Tejú, n.º H-554). Nota-se que não difere dos cistos esquizogônicos por nós descritos em infecções de serpentes por espécies de hepatozoon.

Na Fig. 8 vê-se um corte de fígado de *T. teguixin* de Fortaleza, com um cisto esquizogônico de *H. tupinambis*. Trata-se de um macrocisto em que se podem ver cerca de 36 pequenas células esquizogônicas situadas na periferia do macrocisto, que ao se romper porá em liberdade os micromerozoítas.

Na Fig. 9 temos um corte de pulmão de *T. teguixin* de Fortaleza com cisto esquizogônico do *H. tupinambis*, com dois macromerozoítas.

*Esporogonia* — Tentamos a evolução do parasita em carrapatos, sanguessugas e mosquitos. Desde logo queremos assinalar que, nas nossas experiências, somente conseguimos a evolução esporogônica do *H. tupinambis* em mosquitos, no caso, o *Culex fatigans*. Tentativas para conseguir sua evolução empregando sanguessugas — *Haementeria gracilis* (Weyenbergh), carrapatos — *Amblyomma agammum* (Aragão) ou barbeiros — *Rhodnius prolixus* Stal e *Panstrongylus megistus* (Burmeister) foram negativas.

*Esporogonia no Culex fatigans* — A técnica para a evolução em condições experimentais de hemogregarinas de animais de sangue frio, foi por nós descrita em outro trabalho[9], não sendo necessário aqui repetir. Os resultados positivos foram obtidos com *Culex fatigans*, criados em laboratório, que picaram tejus capturados na Ilha Solteira e parasitados pelo *H. tupinambis*.

Nas duas experiências em que obtivemos a evolução completa do hepatozoon, a temperatura mínima foi de 24.ºC e a máxima de 31.ºC; a umidade variou entre 76 a 82%. Também queremos assinalar que não conseguimos obter a evolução do hepatozoon parasita do teju do Ceará mas somente nos da Ilha Solteira; foram feitas duas tentativas com os lagartos do Ceará, e em uma delas os tejus do Ceará e da Ilha Solteira foram colocados em idênticas condições, porém somente evoluíram os hepatozoons dos tejus da Ilha Solteira. As experiências foram em pe-

queno número para chegarmos a qualquer conclusão; pretendemos posteriormente estudar melhor o assunto.

Os cistos esporogônicos jovens (Fig. 10) são semelhantes aos dos outros hepatozoons que evoluem em mosquitos já descritos pelos autores[9]. Quinze dias após a picada encontramos mosquitos com 50 e mais cistos na cavidade geral, com numerosos esporocistos (Fig. 11). Vinte e dois dias após a picada já encontramos cistos maduros, isto é, com esporozoítas (Fig. 12). O número de esporozoítas varia bastante desde 7 até 30 por esporocisto. Já com 23 dias encontramos os esporozoítas formados, praticamente em todos os cistos (Fig. 12). Finalmente nas Figs. 13 e 14 vemos os esporozoítas livres na cavidade geral do *Culex;* os núcleos são grandes, situados no meio do corpo do organismo ou em uma das extremidades. Os esporozoítas vivos apresentam movimentos lembrando as larvas do *Strongyloides stercoralis;* o núcleo parecia deslocar-se.

*SUMMARY* — The authors examined 40 "tejus" (*Tupinambis teguixin*) from several brazilian localities, and found 9 of them parasitized by *Hepatozoon* spp. In 3 "tejus" from Ceará, and 3 from São Paulo, the parasite has been identified as *Hepatozoon tupinambis* (Laveran & Salibeni, 1909); the parasites of the other 3 lizards, 2 from Sante Catarina and 1 from Rio de Janeiro, have not been identified. The authors describe the schizogonic forms of *H. tupinambis* in snakes, and their evolution in mosquitoes (*Culex fatigans*). Successful experimental evolution has been attained only of the *H. tupinambis*, parasites of the São Paulo -(Ilha Solteira) lizards.

*UNITERMS* — Hemoparasites of Sauria; *Hepatozoon tupinambis; Hepatozoon* evolution.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Livino V. Pinheiro, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará e ao Sr. Rodrigo A. Monteiro, por nos terem enviado tejus do Ceará e de Mato Grosso, respectivamente, à Dra. Maria A. de Souza (do Instituto Oswaldo Cruz) e à Dra. Eva M. Kellen (do Instituto Butantan) por nos terem fornecido, respectivamente, os triatomíneos e as sanguessugas que usamos em nossas experiências; aos universitários Giuseppe Puorto e Wilson Fernandes, pelo auxílio técnico.

### BIBLIOGRAFIA

1. BICE, D. E. — 1965 — A sporozoon Parasite of *Triatoma rubida uhleri* *Rev. Biol. Trop. 13*(2):293-296.
2. CARINI, A. — 1909 — Duas hemogregarinas do *Tupinambis teguixin. Rev. Soc. Cient. de S. Paulo 41*:75-78.
3. DUCCESCHI V. — 1914 — Note di Parassitologia comparata del sangue. *Ann. Ig. Sperim. 24*:269-273.
4. LAVERAN, A. — 1909 — Au suget des Hémogregarines de *Tupinambis teguixin L. C. R. Soc. Biologie 2*:9-10.
5. LAVERAN, A. e SALIBENI — 1909 — Sur une hémogregarine de *Tupinambis teguixin* L. *C. R. Acad. Science Paris, 198*:132-134.
6. LEGER, H. e MAUZELS, E. — 1917 — Hemogregarine intraleucocytaire d'un Saurien, *Tupinambis teguixin. Bull Soc. Path. Exot. 10*:283-284.

7. MIGONE, L. E. — 1916 — Parasitologie de certains animaux du Paraguay. *Bull. Soc. Path. Exot.* *9*:359-364.

8. OSIMANI, J. G. — 1942 — *Haemogregarina triatomae* n. sp. from a South American Lizard *Tupinambis teguixin*, transmited by the reduviid *Triatoma rubrovaria*. *Jl. Parasitology* *28*:147-154.

9. PESSÔA, S. B. BIASI, P. DE e SOUZA, D. M. — 1972 — Esporulação do *Hepatozoon caimani* (Carini, 1909), parasita do jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris* Daud.) no *Culex dolosus* (L. Arribalzaga). *Mem. Inst. Osw. Cruz* *70*:379-383.

10. PLIMMER, H. G. — 1912 — On the blood-parasites found in animals in the Zoological Gardens, during the four years, 1908-1912. *Proc. Zool. Soc.* 406-419.

11. REICHENOW, E. — 1953 — Donflein-Reichenow's Lehbuch der Protozoenkunde. 6.ª Ed. Gustav. Fisher, 1213 p. p.

12. TALICE, R. R. — 1929 — Parasitisme de *Triatoma rubrovaria* par un sporozoáire. *Ann. Parasit. Hum. Comp.* *7*:257-261.

Recebido para publicação em 30-V-1974 e aceito em 10-X-1974.

## EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Fig. 1 — *Hepatozoon* sp. do *T. teguixin* do Estado do Rio de Janeiro. X 1000.

Fig. 2 — *Hepatozoon* sp. do *T. teguixin* do Estado do Espírito Santo. X 1000.

Figs. de 3 a 14 — microfotografias do *Hepatozoon tupinambis*.

Fig. 3 — O parasita apresenta 2 pigmentos; o núcleo do eritrócito está deformado e empurrado para um dos lados do glóbulo, que não mostra seu contorno. X 2000.

Fig. 4 — O parasita apresenta um núcleo frouxo e em forma de rede que se estende por quase toda a extensão do seu corpo. Cápsula parasitária bem visível. X 2500.

Fig. 5 — O parasita alterou e rompeu o núcleo do glóbulo em duas porções que se colocaram nos pólos celulares. X 1800.

Fig. 6 — Nota-se grande hipertrofia do glóbulo vermelho parasitado que alcança 37 micras de comprimento por 12,5 micras de largura; a coloração é muito pálida e o núcleo celular deslocado, é muito delgado e alongado. X 1800.

Fig. 7 — Corte de pulmão do tejú com um cisto esquizogônico, mostrando três merozoítas (macromerozoítas). X 1800.

Fig. 8 — Corte de fígado do tejú, para mostrar um cisto esquizogônico (macrocisto) com cerca de 30 pequenos merozoítas (micromerozoítas). X 1000.

Fig. 9 — Corte de pulmão do tejú para mostrar um cisto esquizogônico com dois macromerozoítas. X 1800.

Fig. 10 — Oocisto jovem na cavidade geral do mosquito com 10 dias após a picada do *Culex fatigans* no tejú. X 300.

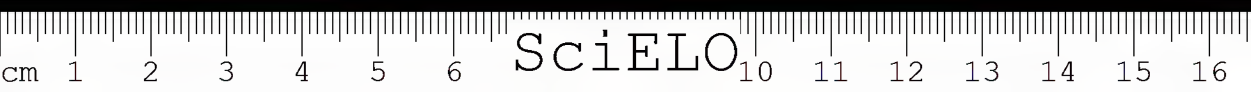
Fig. 11 — Oocisto, 15 dias após a picada. X 400.

Fig. 12 — Oocisto maduro do *Hepatozoon* do tejú da Ilha Solteira (São Paulo); grande número de esporocistos com esporozoítas, 23 dias após a picada. X 1800.

Fig. 13 — Esporozoítas livres na cavidade geral do *Culex fatigans*. X 1000.

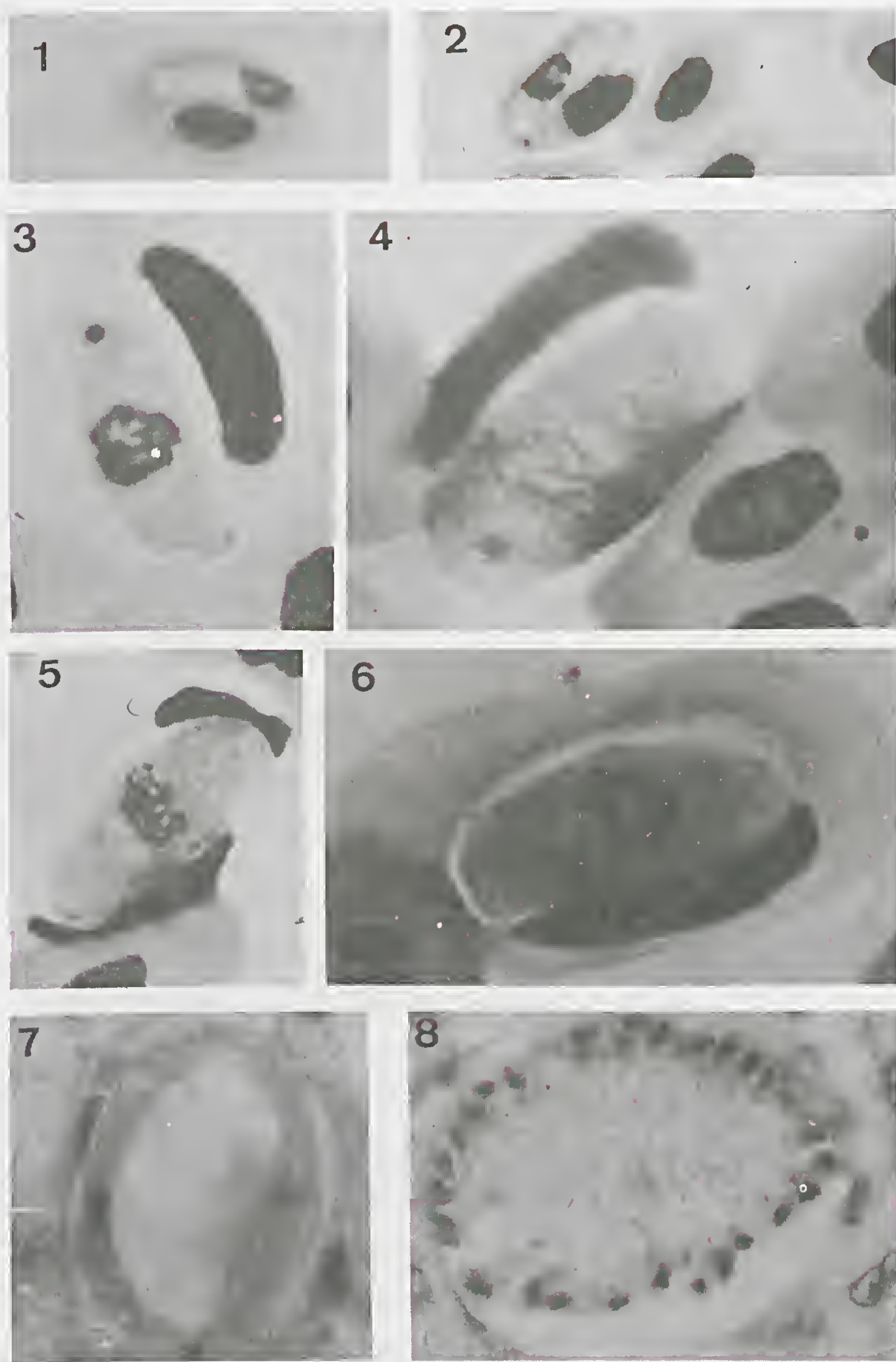
Fig. 14 — O mesmo. X 1800.





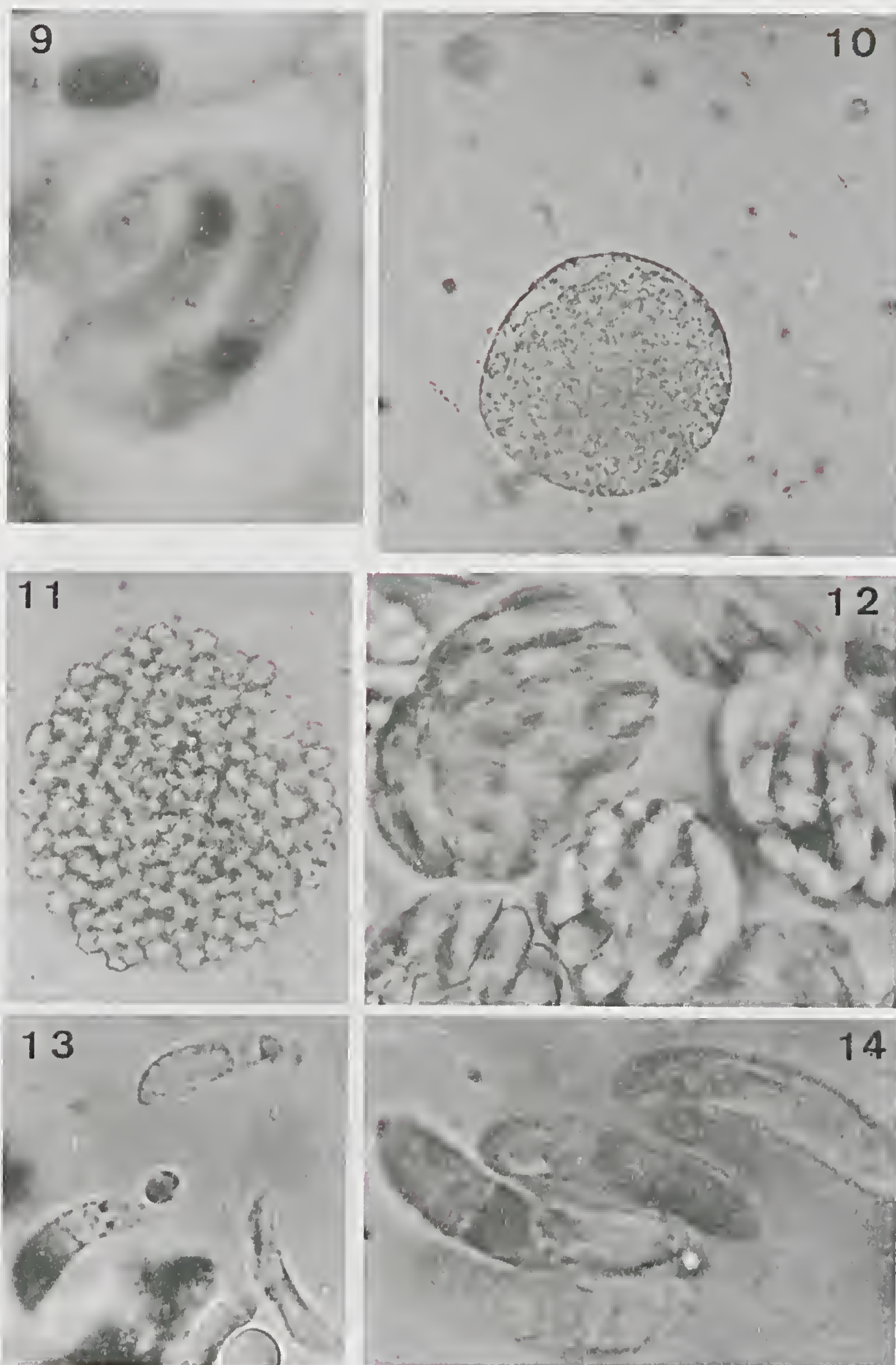
PESSÔA, S. B., BIASI, P. & SACCHETTA, L. — Notas sobre o *Hepatozoon tupinambis* (Laveran e Salibeni, 1909) (Protozoa, Apicomplexa), parasita do Teju (*Tupinambis teguixin* Lineu, 1758) (Sauria, Teiidae).

*Mem. Inst. Butantan*, 38: 123-130, 1974.



PESSÔA, S. B., BIASI, P. & SACCHETTA, L. — Notas sobre o *Hepatozoon tupinambis* (Laveran e Salibeni, 1909) (Protozoa, Apicomplexa), parasita do Teju (*Tupinambis teguixin* Lineu, 1758) (Sauria, Teiidae).

*Mem. Inst. Butantan*, 38: 123-130, 1974.



*Mem. Inst. Butantan*
*38*: 131-136, 1974

# SOME COMPLEMENTARY NOTES ON THE BIOLOGY OF *EXETASIS EICKSTEDTAE* SCHLINGER 1972, A FLY PARASITING MYGALOMORPH SPIDERS

VERA REGINA DESSIMONI VON EICKSTEDT
(Secção de Artrópodos Peçonhentos, Instituto Butantan).

*ABSTRACT* — Biological information on parasitism in the mygalomorph spider *Lasiodora klugi* (C. L. Koch) by *Exetasis eickstedtae* (DIPTERA; ACROCERIDAE) was published in a previous paper (3). In this article some additional notes are given, with photographs of the several stages of the fly. For the first time, six ACROCERIDAE larvae were recorded to emerge from one host spider.

*UNITERMS* — Internal parasitism by Acrocerid flies; Acrocerid spider parasites; *Lasiodora klugi* (ARANEAE; MYGALOMORPHAE) as host of *Exetasis eickstedtae* (DIPTERA; ACROCERIDAE).

## INTRODUCTION

In a previous paper[3] the author related three cases of double parasitism in the mygalomorph spider *Lasiodora klugi* (C. L. Koch), 1842 by dipterous larvae of the genus *Exetasis* (DIPTERA; ACROCERIDAE) which were subsequently described by E. Schlinger as *Exetasis eickstedtae*[6].

On May, 1973 during a routine inspection of the tarantulas kept alive in the "Secção de Artrópodos Peçonhentos" of the Institute Butantan I noticed a new case involving the same host and parasite. In this time, however, six larvae had emerged from the spider. Instances of multiple parasitism were earlier reported by Jenks[4] who mentioned that "twins and triplets and very rarely "quadruplets" are found in an occasional spider, and in these cases the adult flies are dwarfed", and by Baerg[1] who illustrated his work with a photograph where four larvae are seen leaving one single tarantula. This is the first report of six ACROCERIDAE larvae emerging from one host spider.

## MATERIAL AND METHODS

At arrival in the laboratory the spider was placed in a separate wooden cage and checked regularly. It was fed with a live baby mouse every month until its death. Then it was preserved in 75° alcohol and is now in the Arachnological Collection of the Instituto Butantan (N° 4118 IB) identified by the author as *Lasiodora klugi* (C. L. Koch) (MYGALOMORPHAE; THERAPHOSIDAE).

The cage with the parasitic larvae was isolated from the others and checked every day. The several phases of the metamorphosis process were photographed and annotated on a card.

The immature larval stages and one imago (a male) were sent to Prof. E. Schlinger (University of California, Berkeley, U.S.A.) who

ADRESS — C.P. 65 — 05504 — São Paulo — Brasil.





identified them as *Exetasis eickstedtae* Schlinger 1972 (DIPTERA; ACROCERIDAE). These specimens were included in the ACROCERIDAE collection of Prof. Schlinger.

## BIOLOGICAL DATA

On November 17, 1971 the Instituto Butantan received a specimen of *Lasiodora klugi* sent by the company Moinho Santista S.A. The spider had been captured from a hole in a log of rosewood from Itanhem, Bahia (Brazil). It was sent to the Instituto Butantan for information about its medical importance.

On November 16, 1972 the spider moulted in the laboratory and on May 11, 1973, it was found dead in its cage. A tangle of silken threads occupied a great part of the space of the cage and hanging from these threads there were five large yellow-white larvae, and on the ground there was one more (PHOTOGRAPH 1). Tiny newborn insect larvae (planidia) had penetrated into the spider body and parasitized it until reaching the third larval stage. After consuming the major part of the spider's content they emerged from the dying host and crawled to the web spun by the spider a short time before the emergence of the parasites. In this way they guarantee their food supply and may complete the last stage of their metamorphosis on the outside.

From the above data it can be concluded that the larvae need at least a period of 540 days to mature whitin the host's body. I had already observed in 1971[3] a similar case of parasitism where the larval period of *Exetasis eickstedtae* was at least 577 days. Since the spiders are already infested at arrival, the exact duration of this period is not known.

On May 16, 1973 four larvae had pupated. Three of them were hanging from the web, and one was lying on the floor of the cage. Two others died before pupation, and were preserved in 75° alcohol on May 23 and 30, 1973 respectively (PHOTOGRAPH 2).

On June 16, 1973 the specimen on the floor freed itself from the pupal skin and began to walk slowly (PHOTOGRAPH 3). It had an orange to yellowish body with black head and legs.

## DISCUSSION

In all four successful cases of parasitism by *Exetasis eickstedtae* observed at our laboratory, the host has been a *Lasiodora klugi*, a common spider in the distribution area of these flies. The larvae has always emerged from an immature or juvenile female suggesting that it is profitable that the larval phase of *Exetasis eickstedtae* matures whitin a growing up host.

As mentioned by Schilinger[6] "in *E. eickstedtae* successful "superparasitism" may be the rule rather than the exception". It may well





be that several larvae penetrate each host, and that the number of larvae emerging from it depends on the conditions offered by the same.

From the six emerged larvae only one reached adulthood, probably the only that stored sufficient amount of energy (in form of food reserve) to further its subsequent phases of development (pupa — imago).

*RESUMO* — Em trabalho anterior (3), relatamos algumas observações sobre três casos de parasitismo interno entre a aranha caranguejeira *Lasiodora klugi* (MYGALOMORPHAE; THERAPHOSIDAE), e um díptero parasita da família ACROCERIDAE, posteriormente identificado pelo Prof. E. Schlinger (Universidade da Califórnia, Berkeley, E. U. A.) como espécie nova do gênero *Exetasis*, que ele descreveu como *Exetasis eickstedtae* (6). Neste artigo são descritas algumas notas complementares sobre este assunto, ilustradas com fotografias da metamorfose do inseto parasita. Pela primeira vez é mencionado o fato de seis larvas de ACROCERIDAE terem emergido de um único hospedeiro.

UNITERMS: — Moscas de parasitas de
UNITERMS: — Moscas parasitas de aranhas caranguejeiras; *Lasiodora klugi* (ARANEAE; MYGALOMORPHAE) hospedeira de *Exetasis eickstedtae* (DIPTERA;

*ACKNOWLEDGEMENTS*: I am indebted to Prof. E. Schlinger who kindly identified the ACROCERIDAE specimens, to Dr. N. Papavero (Museu de Zoologia, Universidade de S. Paulo) for reviewing the manuscript and to Ms. Heller for translating it.

REFERENCES

1. BAERG, W. J. — The tarantula. Lawrence, Kansas vii + 1-88,19 illustr., 1958.
2. EASON, F. R., W. B. PECK and W. H. WHITCOMB — Notes on spider parasites, including a reference list, *J. Kansas Ent. Soc.*, *40*(3):422-434, 1967.
3. Von EICKSTEDT, V. R. D. — Three cases of parasitism in the Mygalomorph spider *Lasiodora klugi* (C. L. Koch) by a fly of the genus *Exetasis* (DIPTERA; ACROCERIDAE) in Brazil, *Mem. Inst. Butantan*, *35*:139-146, 1971.
4. JENKS, G. E. — Marvels of metamorphosis. *Nat. Geogr. Mag.*, *74*(6):807-828, 1938.
5. MONTGOMERY, T. H. — Studies on the habits of spiders, particularly those of the mating period. *Proc. Acad. Nat. Sci. Philad.*, *55*:51-149, 1903.
6. SCHLINGER, E. — A new Brazilian panopine species, *Exetasis eickstedtae*, reared from the Theraphosid spider, *Lasiodora klugi* (C. L. Koch), with a description of its immature larval stages (DIPTERA; ACROCERIDAE), *Papéis Avulsos Zool.*, S. Paulo, *26*(7): 73-82, 1972.

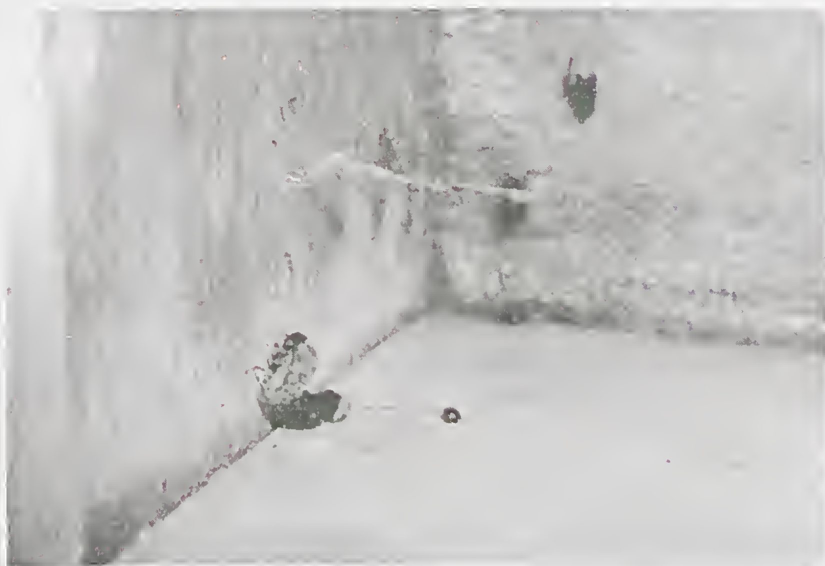
Recebido para publicação em 14-V-1974 e aceito em 15-IX-1974.



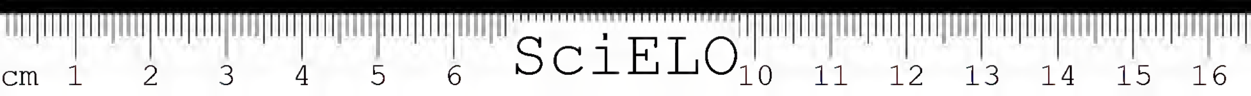
PHOTOGRAPH 1 — Five *Exetasis eickstedtae* larvae hanging from the web spun by *Lasiodora klugi* and another larva on the floor of the cage. At right, a container with the spider's skin.



PHOTOGRAPH 2 — In the foreground, two dead *Exetasis eick stedtae* larvae preserved in 75.° alcohol, and in the background, four pupae.



PHOTOGRAPH 3 — Imago of *Exetasis eickstedtae* freed from the puparium.


cm 1 2 3 4 5 6
SciELO
10 11 12 13 14 15 16

*Mem. Inst. Butantan*
*38*: 137-146, 1974

# NOTES ON *Xenopholis* PETERS AND *Paroxyrhopus* SCHENKEL*
## (Serpentes: *Colubridae*)

by A. R. HOGE and P. A. FEDERSONI JR.**
Seção de Herpetologia, Instituto Butantan - São Paulo - Brasil

*ABSTRACT* — The genus *Paroxyrhopus* Schenkel is considered as a synonym of *Xenopholis* Peters.

The species *reticulatus* is considered as a synonym of *undulatus*.

*UNITERMS* — *Paroxyrhopus* Schenkel, 1902. *Paroxyrhopus reticulatus* Schenkel, 1902. *Xenopholis* Peters, 1869. *enopholis scalaris* (Wucherer) 1861. *Xenopholis undulatus* (Jensen) 1900.

Recently the collection of additional specimens of *Paroxyrhopus undulatus* (auct.), gave us the opportunity to give additional informations on the systematic position of the genus and the species.

In 1900, Jensen (:106), described *Oxyrhopus undulatus*, based on a specimen from Lagoa Santa, Minas Gerais, Brazil.

In 1902, Schenkel (:168), described a new species and genus *Paroxyrhopus reticulatus*, based on a specimen collected at Bemalcue, Paraguay. Schenkel called attention to the fact that *Paroxyrhopus* may be a synonym of *Xenopholis* Peters: "Since both have a peculiar form of the neural spine of the vertebrae, expanded laterally above, forming a shield which is quite rough and divided by a median groove; the number of maxillary teeth and other characters". He only decided to describe the new genus, because of the separated prefrontals; two nasals and presence of hypapophyses on posterior vertebrae.

In 1913, Werner (:30) described *Oxyrhopus latifrontalis*, based on a specimen from eastern part of the state of Minas Gerais, Brazil.

In 1923, Amaral (:90) described *Paroxyrhopus atropurpureus*, based on a specimen from Nova Baden, Minas Gerais, Brazil, and other two specimens, also from Minas Gerais, Brazil. Amaral distinguished his species from *P. reticulatus* by: "*Paroxyrhopus atropurpureus* can be distinguished from *P. reticulatus*, by its physiognomy and general color, and by having an entire nasal, two postoculars and supraocular not turned downwards behind the orbit".

In 1926, Amaral (:18) redescribed and published drawing of *Paroxyrhopus atropurpureus*.

In 1929, Amaral (:208), put his *P. atropurpureus* in the synonymy of *Paroxyrhopus latifrontalis*, maintaining *Paroxyrhopus reticulatus* Schenkel as a valid species.

* Supported by Grant o Conselho Nacional de Pesquisas — CNPq.
** Fundo Especial de Despesas do Instituto Butantan — FEDIB.

ADRESS —C.P. 65 — 05504 — São Paulo — Brasil.

In 1970, Bailey, in Peters & Orejas-Miranda (:238) has pointed out, *Oxyrhopus undulatus* as a prior name for *Paroxyrhopus latifrontalis* (auct.)

Peters & Orejas-Miranda l.c. maintain *P. reticulatus* and *P. undulatus* as distinct species, although Bailey thinks that the two species are not distinguishable.

Peters & Orejas-Miranda give the following key:

"1 — Two postoculars; supraocular not turned down behind orbit; unicolor dorsally, sides variegated with small spots or reddish color ............ *undulatus*

One postocular; supraocular has downward projecting extension behind orbit; dorsum with large brownish-black spots ........................ *reticulatus*"

Recently we had opportunity to collect more five specimens of *Paroxyrhopus* from Mato Grosso and São Paulo; together with the specimens already in the collection of IB, we have now 20 specimens; one of the specimens: IB — 10.276, a female from Pedra do Sino, Minas Gerais, presents: 1 postocular; the supraocular with downward projection extension behind the orbit, wich is tipical of *Paroxyrhopus reticulatus* Schenkel (see fig. 12 through 14) the coloration and pattern is identical of the one given for *Paroxyrhopus undulatus* Jensen.

We see no reason to maintain the two species as distinct. There is no doubt that *Paroxyrhopus* and *Xenopholis*, are closely related as suspected by Schenkel: both have a peculiar form of the neural spine of the vertebrae, expanded laterally above, forming a shield which is quite rugose and divided by a median groove (see fig. 5 through 8), and it's interesting to note that in some specimens of *Paroxyrhopus* (from *Xenopholis*, we had only the opportunity to examine two specimens), there is a hole in the quadrate (see fig. 10). Similar dorsal pattern (see fig. 15 and 16).

*Xenopholis* Peters

1869 — *Xenopholis* Peters, Monats. Akad. Wiss. Berlin — 1869:440

1874 — *Gerrhosteus* Cope, Proc. Acad. Nat. Sci. Philadelphia — 1774:71
Type species — *Gerrhosteus prosopis* Cope.

1902 — *Paroxyrhopus* Schenkel, Verh. Naturforsch. Ges. Basel, *13*:168
Type species — *Paroxyrhopus reticulatus* Schenkel.

1925 — *Sympeltophis* Werner, Sitzb. Nath. — Naturwiss. Kl. Akad. Wiss. Wien abt. 1, 134:52, fig. 1
Type species — *Sympeltophis ungalioides* Werner
Type species — *Xenopholis Braconnieri* Peters

Range: Amazonian, Bolivia, Ecuador, Peru and Brazil — Southern Brazil (Minas Gerais, Mato Grosso) and Paraguay.





*Xenopholis undulatus* (Jensen)

1900 — *Oxyrhopus undulatus* Jensen, Vidensk. Medd. Naturhist. Foren. Kjöbenhavn 1899 (1900:106, fig. 2)

1902 — *Paroxyrhopus reticulatus* Schenkel, Verh. Naturforsh. Ges. Basel 13:169, fig. 5-5e.
Type locality — Bemalcue, Paraguay

1913 — *Oxyrhopus latifrontalis* Werner, Mitt. Naturhist. Mus. Hamburg — 30:30
Type locality — Eastern part of Estado de Minas Gerais, Brazil.

1923 — *Paroxyrhopus atropurpureus* Amaral, Proc. New England Zool. Club, 8:90
Type locality — Nova Baden — Brazil

1926 — *Paroxyrhopus atropurpureus* Amaral, Arch. Mus. Nac. Rio de Janeiro — 26:112, fig. 1-3 — est. III

1929 (1930) — *Paroxyrhopus latifrontalis;* Amaral, Mem. Inst. Butantan — 4:208

1970 — *Paroxyrhopus undulatus;* Bailey in Peters & Orejas — Miranda — Cat. Neotrop. Squamata — I — Snakes:238

1970 — *Paroxyrhopus reticulatus;* Peters & Orejas — Miranda — Cat. Neotrop. Squamata I — Snakes:238
Type locality: Lagoa Santa, Minas Gerais, Brazil.

Range: Paraguay (type specimen of *P. reticulatus*); Brazil, states of Goiaz, Minas Gerais, Mato Grosso, São Paulo and Paraná.

The occurrence of *Xenopholis undulatus* from Amazonian Colombia, is based in a misidentified specimen.

Rostral slightly broader than deep; slightly visible from above; internasals slightly longer than broad; prefrontals longer than broad; frontal as long as broad, as long as its distance from the tip of the snout, much shorter than the parietals; supraocular, small, sometimes projecting downward the orbit, by a fusion with the upper postocular; nasal entire; loreal twice as long as deep; one preocular, larger than the supraocular, in contact with the frontal; postocular, two (fig. 12), rarely one, by fusion of the upper one, with supraocular, the upper one largest (fig. 13), temporals, 1+2; eight upperlabials, $4^{th}$ and $5^{th}$ entering the orbit, sometimes, the $3^{rd}$ searcely entering; 8-9 lowerlabials, 4 in contact with the anterior chin shields, which are generally as long as the posterior ones; dorsals in 19/19/17 rows; ventrals: 166-181+1/2; there is no sexual dimorphism in number of ventrals (males 169-178 and females 166-181+1/2); anal entire; subcaudals divided, 35-45, no sexual dimorphism (males 35-45 and females 36-44).

Blackish brown above, with lateral projections, sides variegated with small redish spots (in life) (fig. 15); belly yellowish invading dorso--lateral pattern (fig. 15). Head (fig. 14) blackish brown, upper and lower labials, yellowish.

HOGE, A. R. & FEDERSONI JR., P. A. — Notes on *Xenopholis* Peters and *Paroxyrhopus* Schenkel (Serpentes Colubridae).

*Mem. Inst. Butantan, 38*: 137-146, 1974.

## SPECIMENS EXAMINED:

| IB. colection number | Locality |
|---|---|
| 3.003* | — Nova Baden — MG |
| 9.649 | — Pedregulho — SP |
| 10.275 | — Franca — SP |
| 10.276 | — Pedra do Sino — MG |
| 10.325 | — Rio Verde — GO |
| 10.992 | — Barretos — SP |
| 15.508 | — Ouro Fino — MG |
| 17.526 | — Franca — SP |
| 18.936 | — Três Lagoas — MT |
| 21.661 | — Três Lagoas — MT |
| 21.906 | — Três Lagoas — MT |
| 22.216 | — Três Lagoas — MT |
| 23.689 | — Jardinópolis — SP |
| 34.302 | — Araucária — PR |
| 34.574 | — 17 Km above the dam of Ilha Solteira-Paraná River — MT |
| 34.575 | — 70 Km above the dam of Ilha Solteira-Paraná River — MT |
| 35.296 | — Without locality |
| 35.782 | — 20 Km above the dam of Ilha Solteira-Paraná River — SP |
| 35.981 | — 14 Km above the dam of Ilha Solteira-Paraná River — MT |
| 36.755 | — 1 Km above the dam of Ilha Solteira-Paraná River — MT |

* Type of *Paroxyrhopus atropurpureus* (Amaral)

TABLE I

*Paroxyrhopus undulatus*

| IB. col. n.º | Sex | Ventrals | Sub-caudals | Length in mm | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Head | Body | Tail |
| 10.325 | male | 169 | 39/39 | 13,0 | 298 | 56 |
| 15.508 | male | 174 | 35/35 | 14,1 | 352 | 54 |
| 17.526 | male | 174 | 18 + n — CM | 9,4 | 206 | 17+n |
| 34.302 | male | 174 | 44/44 | 11,5 | 223 | 27 |
| 34.574 | male | 176 | 44/44 | 11,5 | 262 | 48 |
| 34.575 | male | 172 | 45/45 | 11,5 | 254 | 47 |
| 35.782 | male | 178 | 40/40 | 10,0 | 199 | 31 |
| 35.981 | male | 175 | 30 + n — CM | 14,4 | 372 | 49+n |
| 9.649 | female | 175 | 38/38 | 13,0 | 335 | 54 |
| 10.275 | female | 175 | 38/38 | 14,3 | 359 | 60 |
| 10.992 | female | 173 | 40/40 | 12,3 | 336 | 55 |
| 23.689 | female | 176 | 36/36 | 12,5 | 320 | 50 |
| 10.276 | female | 176 | 44/44 | 12,2 | 318 | 57 |
| 18.936 | female | 174 | 40/40 | 13,8 | 354 | 58 |
| 21.661 | female | 173 | 38/38 | 12,6 | 325 | 51 |
| 21.906 | female | 166 | 41/41 | 9,2 | 173 | 29 |
| 22.216 | female | 172 | 36/36 | 12,7 | 343 | 56 |
| 36.755 | female | 175 | 36/36 | 13,6 | 329 | 46 |
| 35.294 | female | 180 | 44/44 | 11,1 | 255 | 43 |
| 3.003* | male | 181 + 1/2 | 40/40 | 13,9 | 364 | 62 |

* Type of *Paroxyrhopus atropurpureus* (Amaral)





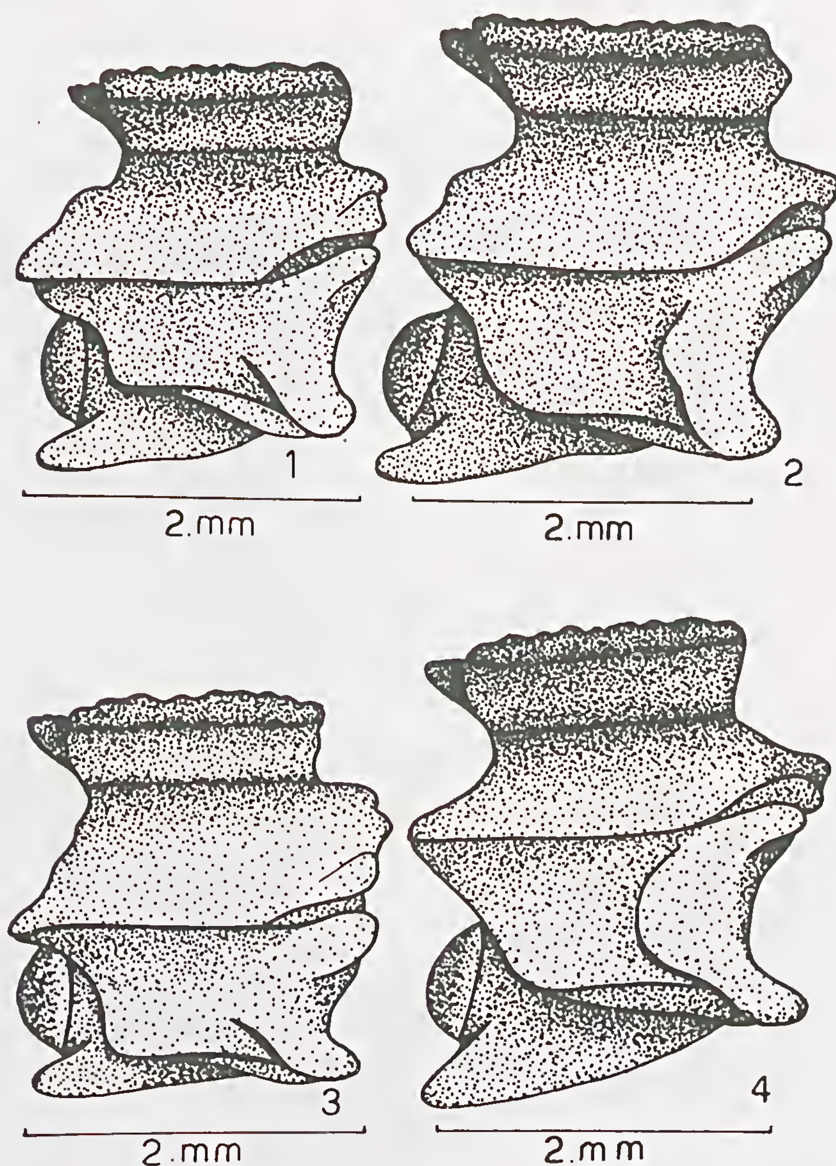



Fig. 1 — ***Xenopholis undulatus*** — IB. 18.936 — vertebrae — lateral view-posterior third of the body

Fig. 2 — ***Xenopholis undulatus*** — IB. 18.936 — vertebrae — lateral view-mid-body

Fig. 3 — ***Xenopholis scalaris*** — IB. 21.129 — vertebrae lateral view-posterior third of the body

Fig. 4 — ***Xenopholis scalaris*** — IB. 21.129 — vertebrae — lateral view-mid-body

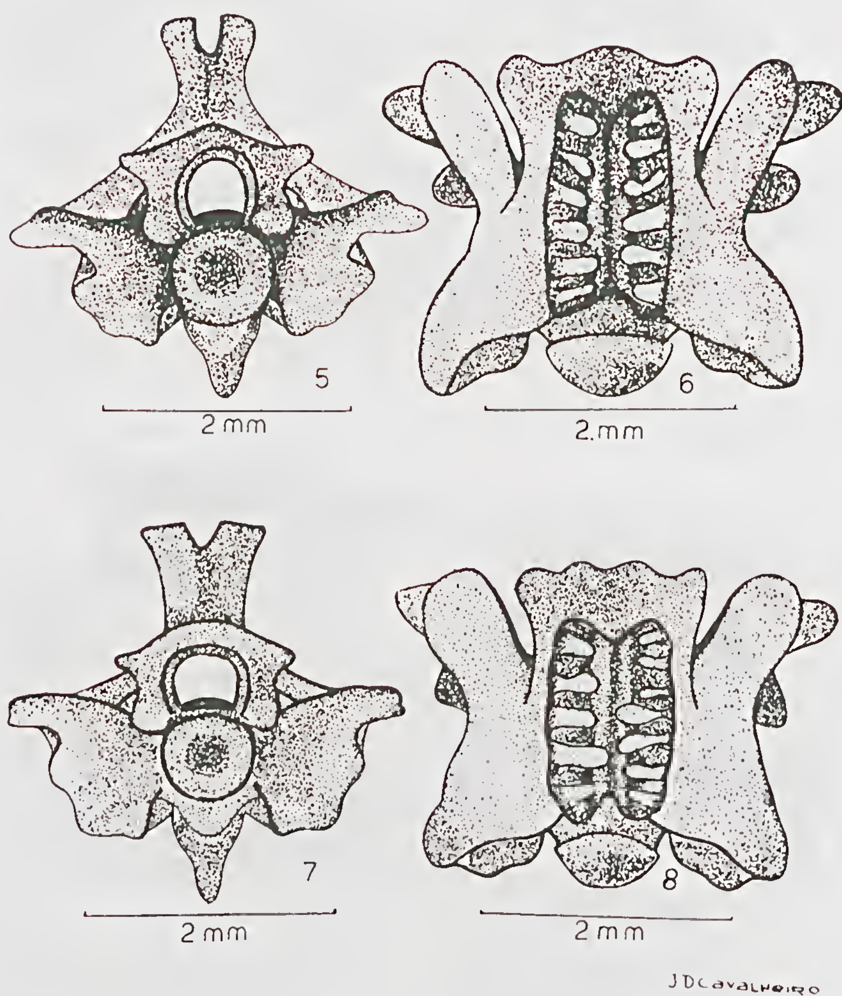
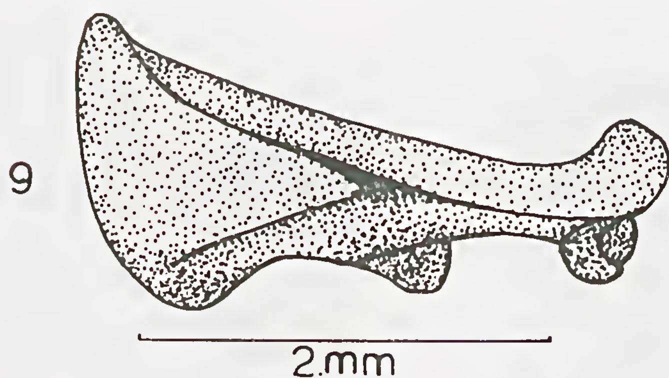
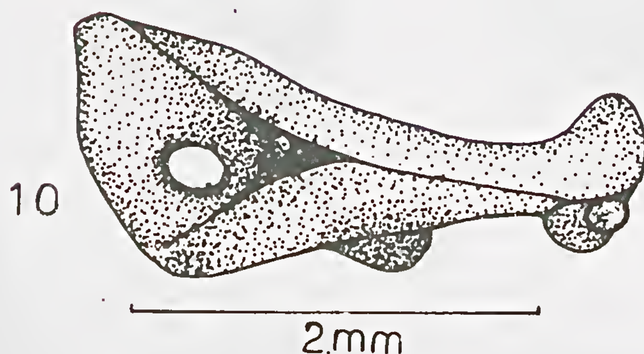



Fig. 5 — *Xenopholis undulatus* — IB. 18.936 — vertebrae — frontal view-mid-body
Fig. 6 — *Xenopholis undulatus* — IB. 18.936 — vertebrae — dorsal view-mid-body
Fig. 7 — *Xenopholis scalaris* — IB. 21.129 — vertebrae — frontal view-mid-body
Fig. 8 — *Xenopholis scalaris* — IB. 21.129 — vertebrae — dorsal view-mid-body



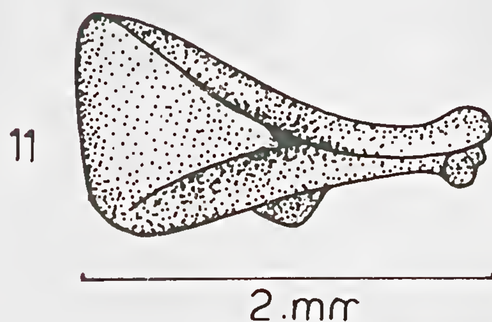




Fig. 9 — *Xenopholis undulatus* — IB. 21.661 — quadrate
Fig. 10 — *Xenopholis undulatus* — IB. 18.936 — quadrate
Fig. 11 — *Xenopholis scalaris* — IB. 21.129 — quadrate

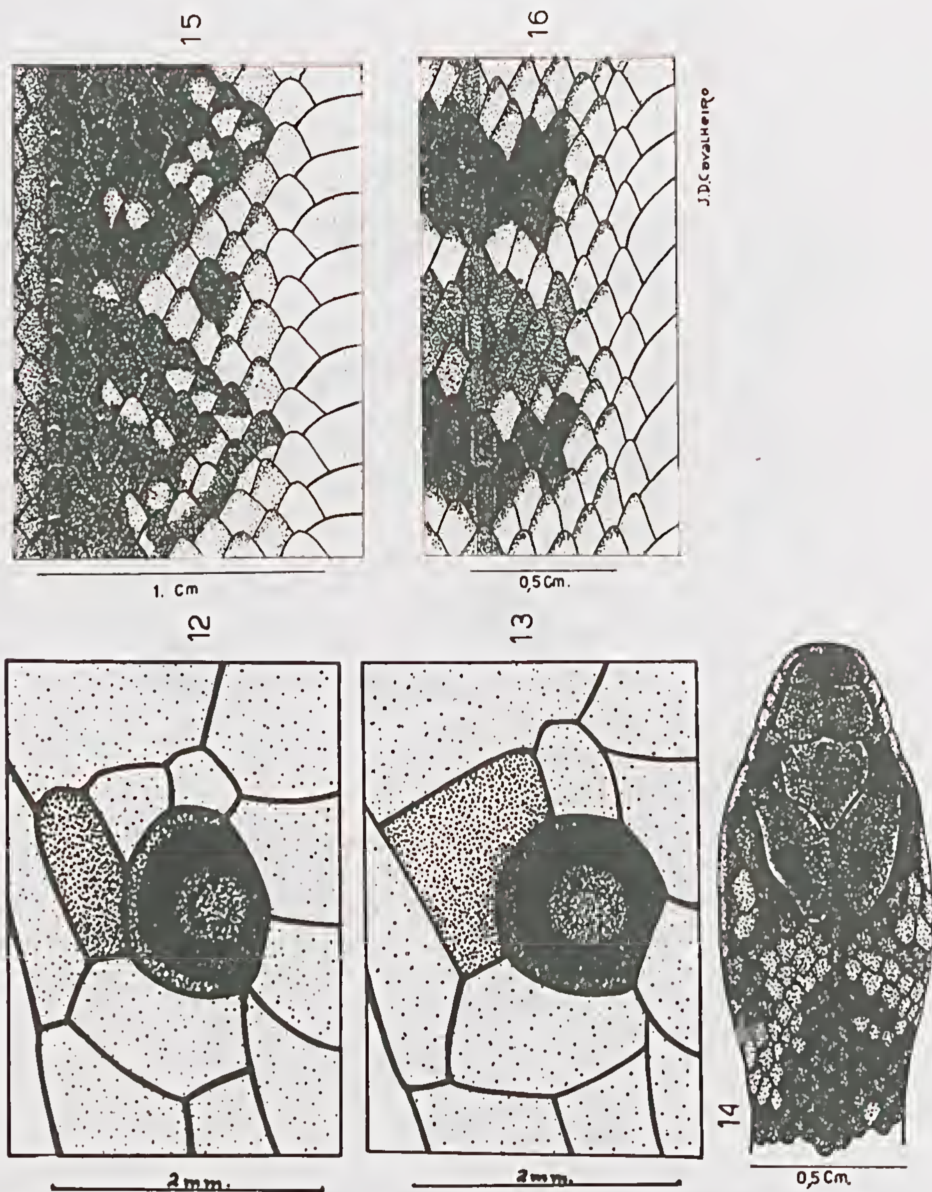



Fig. 12 — *Xenopholis undulatus* — IB. 34.574 — two postoculars and the supraocular not turned down behind orbit.

Fig. 13 — *Xenopholis undulatus* — IB. 10.276 — One postocular and supraocular has downward projecting extension behing orbit.

Fig. 14 — *Xenopholis undulatus* — IB. 34.574 — dorsal view of the head

Fig. 15 — *Xenopholis undulatus* — IB. 34.574 — Dorso-lateral pattern

Fig. 16 — *Xenopholis scalaris* — IB. 21.129 — Dorso-lateral pattern

HOGE, A. R. & FEDERSONI JR., P. A. — Notes on *Xenopholis* Peters and *Paroxyrhopus* Schenkel (Serpentes Colubridae).

*Mem. Inst. Butantan, 38*: 137-146, 1974.

*RESUMO* — O gênero *Paroxyrhopus* Schenkel é considerado sinônimo de *Xenopholis* Peters. A espécie *reticulatus* é considerada sinônimo de *undulatus*.

*UNITERMOS* — *Paroxyrhopus* Schenkel, 1902; *Paroxyrhopus reticulatus* Schenkel, 1902; *Xenopholis* Peters, 1869; *Xenopholis scalaris* (Wucherer) 1861; *Xenopholis undulatus* (Jensen) 1900.

## ACKNOWLEDGEMENTS

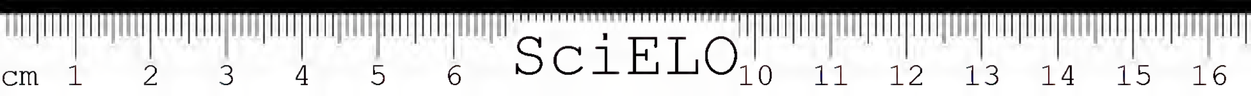
We are indebted to Mr. João Domingues Cavalheiro for the drawings and preparation of skulls.

---

Recebido para publicação em 04-VI-1974 e aceito para publicação em 10-X-1974.






cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15 16

*Mem. Inst. Butantan*
*38*: 147-158, 1947

# NOTES ON *TRIMERESURUS BRONGERSMAI* HOGE 1969 (SERPENTES, VIPERIDAE, CROTALINAE)*

by A. R. HOGE and S. A. DE LEMOS ROMANO

Seção de Herpetologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

*ABSTRACT* — Redescription of *Trimeresurus brongersmai* Hoge 1969, and relationship with: *T. puniceus* (Boie) 1827; *T. cornutus* Smith 1930; *T. kanburiensis* Smith 1943 and *T. borneensis* Peters 1872 wich is considered a valid species.

*UNITERMS* — *Trimeresurus brongersmai* Hoge 1969; *T. puniceus* (Boie) 1827; *T. cornutus* Smith 1930; *T. kanburiensis* Smith 1943 and *T. borneensis* (Peters) 1872.

This paper deals with a full description of *Trimeresurus brongersmai* Hoge 1969, first described in an abstract of the annual meeting of the "Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência" in "*Ciência e Cultura*" *21* (2), 1969, and notes on related species.

*Abbreviations used in reference to specimens:*

British Museum (Natural History) London (BMNH); Rijks Museum v. Natuurlijke Historie Leiden (RMNH); United States National Museum, Washington D.C. (USNM); Museum National d'Histoire Naturelle, Paris (MNHNP); Instituto Butantan, São Paulo (IB); Naturhistoriska Riksmuseum Stockholm (NHRS).

## KEY TO THE SPECIES OF THE *PUNICEUS* GROUP

I — Ventrals more than 190; caudals more than 71; supraoculars broken up in 3-4 scales; strongly erected and convergent forming a horn-like appendage (Fig. 4); Dorsal pattern (see Fig. 6); Dorsals 21-21-17 .................................... *cornutus*

II — Ventrals fewer than 177; caudals fewer than 58;

A — 8 scales between the supraoculars which are large and divided on their inner margins; dorsals in 19-19-15 rows .................. *kanburiensis*

B — 10-14 scales between the supraoculars

1 — Snout strongly projected, and squarish (Fig. 2); ventrals 136-150; supraoculars divided and divergent (Fig. 2); single elongate dorsal blotches, fused, opposite

* Supported by Grant NIH, National Library of Medicine LM 00418-01, and Conselho Nacional de Pesquisas of Brazil 1966-1967.

ADRESS — C.P. 65 — 05504 — São Paulo — Brasil.





or alternated; 2nd upper labial forming the anterior border of the loreal pit (Fig. 1) dorsal pattern (see Fig. 3 and 11). Dorsals (21-20) -19-15 ........ *brongersmai*

2 — Snout not strongly projected

a — 2nd upper labial usually not forming the anterior border of the loreal pit (Fig. 7); dorsals in 21--23 rows; 12-15 series of scales between the supraoculars which are narrow or broken up in erected scales; snout rounded (Fig. 8) Dorsal pattern see fig. 9 and 12 *puniceus*

b — 2nd upper labial forming the anterior border of the loreal pit (Fig. 13); dorsals in 19 — (exceptionally 21) rows; 10-11 series of scales between the supraoculars which are generally divided and knoblike (Fig. 13); snout prominent, raised above the nostrils (Fig. 13); Dorsal pattern (Fig. 10 and 14) ...................... *borneensis*

*Trimeresurus brongersmai* Hoge Fig. 1, 2, 3 and 11.

1969 — *Trimeresurus brongersmai* Hoge, *Ciência e Cultura, 21* (2) :459.
*Type locality:* Lugu, Simalur, west coast of Sumatra.
Holotype, RMNH Nr. 5654 A; from Lugu, Simalur, Sumatra; 4-1913; E. Jacobson col.

*Diagnosis.* A *Trimeresurus* (fig. 1, 2 and 3) with the second upper labial forming the anterior border of loreal pit; supraoculars broken up in non convergent, strongly erected and pointed scales; snout strongly projected and laterally expanded; anterior part of nasals well visible from front and forming, together with the rostral the tip of the snout; supraoculars separated by 11-12 scales; ventrals 136-150; caudals 41-48; dorsals in [20-21] — 19-15 longitudinal smooth rows. Dorsal pattern of elongated markings, confluent or alternate, and below streaks of same length; the lateral streaks gradually fusing, with the dorsal ones, on the back of the body.

*Description of holotype* — Rostral slightly wider than high, nearly twice as broad at base as at tip; internasals large, separated by two scales, strongly projected laterally and forewards; two (left side, by fusion of 1st and 2nd) scales between internasals and upper preocular, three on the rigth side; nasal entire, anterior part projected and well visible from front, separated from the first upper labial; second upper





labial forming the anterior border of the loreal pit; a small scale between nasal and upper part of 2nd upper labial; third upper labial largest, separated from the elongate subocular by 1+2 scales; supraocular broken up in 4-5 strongly erected and divergent spinelike scales; scales on upper head smooth and imbricated; temporals strongly keeled or knobbed on tip; 11 scales on a line between the erected supraoculars; 1-2 postoculars and an elongate subocular; horizontal diameter of eye less than the distance between eye and mouthcleft; 10 upper and 10-11 lower labials; first pair of lower labials not in contact behind the symphysial; a single pair of chin shields longer than wide, each one separated from the symphysial by a scale resulting from the transverse division of first lower labial. Color grey with elongated rectangular dark grey dorsal markings, fused, opposite or alternated with the ones of the other side; the dorsal blotches resulting from the fusion of right and left marking have a lighter center. The dorsal blotches are formed by single dorsolateral marking, not by two vertical ones, separate or fused, as in *T. puniceus* (Boie) 1827. Just below the dorsal markings there are, on the 4-5th row, longitudinal dark streaks, fused with the dorsal ones on the posterior part of the body. Belly whitish grey, heavyly powdered with dark; the outer side of ventrals more densely powdered and spotted with dark. The dark color of outerside of ventrals invades the paraventral row in a manner not unlike a saw; 29 dorsal blotches, 11 on tail; lower part of tail dark grey; a whitish postocular streak. Dorsals in 21-19-15 longitudinal rows of smooth scales (some scales in the vertebral region of neck are slightly knobbed on the tip). Ventrals 150; anal 1; caudals 47/48 rows. Hemipenis spinous from bifurcation at tip; bifurcation at 4th caudal; hemipenis extending to 8-9 subcaudal. Head 26,1 mm; body + head 340 mm, tail 66 mm.

*Paratypes* — RMNH 5654 B now IB 29925; male; same locality and col. as holotype; Dorsals 20-19-15; Ventrals 148; anal 1; Caudals 48/48; 9 upper labials; 11 scales between supraoculars. RMNH 5649, male, Sibogo; Simalur, Sumatra, same col, as holotype, Dorsals 20-19-15; Ventrals 150; anal 1; Caudals 48/48; 10 upper labials; 11 scales between supraoculars. RMNH 5181, female, Sinabang, Simalur, Sumatra, same col. Dorsals 20-19-15; Ventrals 136; anal 1; Caudals 41/42. USNM 30758, Simalur (Fig. 1 and 2).

RELATIONSHIP. *Trimeresurus brongersmai* is closest to *Trimeresurus borneensis* Peters 1872 from which it differs by: lower number of ventrals, 136-150 against 152-168; dorsal rows in 19 against 21; supraoculars long and strongly erected, against small and more knoblike ones in *borneensis* fig. 2 and 13; the greyer color, and different dorsal pattern (Fig. 11), specially the small sawlike intrusions of dark ventral color in dorsals. Easily distinguished from *T. cornutus* Smith (Fig. 4, 5 and 6), the only species besides *T. brongersmai* with strongly erected supraoculars, by the shape of the snout; and by the divergent instead of convergent supraocular spines (Fig. 1 and 2) and the lower number of ventrals 135-150 against 193-197; from *T. kanburiensis* Smith 1930 by the number of scales between supraoculars 11-12 against 8; the erected





spinelike supraoculars against large undivided and not erected in *T. kanburiensis;* possibly the higher ventral counts in *kanburiensis* (known only from type, V. 159) and dif. shape of snout. From *T. puniceus, T. brongersmai* can be distinguished by; Dorsals in 19 against 21-23 rows; second upper labial forming anterior border of pit; the very long erected supraoculars; the completely different shape of snout (Fig. 1, 2, 4.); different dorsal pattern as explained in Holotype description (and fig. 11); and its smaller size 516 mm.

*Material:* All specimens examined are from the island Simalur (Simeuloeé) on the West coast of Sumatra, Indonesia. RMNH 5654 A (Holotype) from Lugu; IB 29925 (former RMNH 5654 B) from Lugu; RMNH 5649 from Sibogo; RMNH 5181 from Sinabang; USNM 30758 from Simalur.

Range: known only from Simalur.

*Trimeresurus borneensis* (Peters) Fig. 10, 13 and 14

1872 — *Atropophis borneensis* Peters, Ann. Mus. Civ. Stor. Nat. Genova, *3*:41.

1893 — *Bothrops sandakanensis* van Lidth de Jeude, Notes Leyden Mus. *15*:256 + fig.

1896 — *Lachesis borneensis;* Boulenger, Cat. Sn. Brit. Mus. (Nat. Hist.) *3*:561.

1969 — *T.* [*rimeresurus*] *borneensis;* Hoge, Ciência e Cultura, *21*(2): 459.
*Type locality:* Sarawak, Borneo
*Type:* Mus. Genova

Related to *puniceus* from which it differs in having a more prominent and truncated snout; strongly raised above the nostrils (Fig. 13); 10-11 scales between the supraoculars instead of 12-14; 2nd upper labial forming the anterior border of loreal pit (Fig. 13); supraoculars generally entire or knoblike (Fig. 13). From *T. brongersmai* it is distinguished by the higher number of ventrals 152-168 against 136-150; dorsal scales in 21 rows; supraoculars small and knoblike.

*Range:* Known only from Borneo (see notes under *T. puniceus* l. c.).

*Specimens examined:* All specimens are from Borneo. RMNH 8405 (F 101) and 8405 (F 44) from Kenepai pass; RMNH 8407 from Nanga Raoen, RMNH 8253 from above Mahakkam; RMNH 8406 from Siniai river; RMNH 4338 (without label) from Sandakan bay; RMNH 4338 (713) same locality as 4338 (Types of *B. sandakanensis* (van Lidth de Jeude 1893); BMNH 91-8-29-38 from Mt Dulit Sarawak; BMNH 1900-7-18-6 from Gunong Merch Perak, 3000 ft; BMNH 94-6-30-67 from Paitan North Borneo; BMNH 1911-1-30-29.30 (two specimens) from Kidi district, Sarawak; BMNH 92-10-7-16 and 94-8-37 from Baram Sarawak; BMNH 92-6-3-10 Mt Dulit; BMNH 151 1 a juvenile mentioned as *puniceus* from Java, but which is really a *borneensis* (see notes under *T. puniceus*).





*Trimeresurus cornutus* Smith

1930 — *Trimeresurus cornutus* Smith, Ann. Mag. Nat. Hist. *6* (10) :682.
*Type locality:* Fan-si-pan M$^{ts}$, Tong King.
*Type:* BMNH 1930-11-16-2- London.
*Range:* Known only by type specimen and a specimen in MNHNP from Tong-King without further information.

Different from related forms by the strongly erected and convergent supraoculars (Fig. 4 and 5) and high number of ventrals 193-197.

Specimens examined: BMNH 1930-11-16-2 from Fan-si-pan M$^{ts}$, Tong-King; MNHNP 1935-35- from Tong-King.

*Trimeresurus kanburiensis* Smith

1943 — *Trimeresurus kanburiensis* Smith, Fauna Brit. India 3 (Serp.) : 519.
*Type locality:* Near Kanburi, Thailand.
*Type:* In BMNH London.
*Range:* Known only from type locality.

*Trimeresurus puniceus* (Boie) Fig. 7, 8, 9 and 12.

1827 — *Cophias punicea* Boie, Isis v. Oken *20* :561.

1837 — *Trigonocephalus puniceus;* Schlegel Phys. Serp. *2* :545-pl. XIX, fig. 10 and 11.

1854 — *Atropos puniceus;* Duméril, Bibron et Duméril, Erpet. Gén. *7* :1519.

1872 — *Atropohis puniceus;* Peters, Ann. Mus. Civ. Stor. Nat. Genova *3* (2) :41.

1892 — *Trimeresurus puniceus;* Boettger, Ber. Offenb. Ver. Naturk: 136.

1896 — *Lachesis puniceus;* Boulenger, Cat. Sn. Brit. Mus. *3* :560.

1968 — *Trimeresurus puniceus;* [partim] Leviton, Ven. An. & Their Venoms I:570.
*Type locality:* Java.
*Type:* In RMNH Leyden.
*Range:* Sumatra, Java and Natuna Islands.

*Specimens examined:* Two specimens in the BMNH 44-2-22-6 a male and a female from Borneo colected by Sir Low, are the same mentioned by Boulenger in his catalogue (3:561 specimens e and f), and are true *T. puniceus.* They are the only known specimens of *puniceus* from Borneo. On an old label on the container of these specimens can be read Java! There is also a label in the jar with Gray's writing "*Atropos*

*acontia*". Originally Gray (Zool. Miscel.: 49) had only a single specimen. Another jar labeled as *puniceus*, Java contain a single specimen who is obviously a *T. borneensis*, also the only specimen of *T. borneensis* known outside of Borneo.

It is highly probable that an exchange of specimens has occured before Boulenger's time.

BMNH 85.12.3.32-33 (three specimens) from Willis M[ts], Kediri Java, 5000 ft; BMNH 1915-12-2-43 from Sungai Kumbang, Sumatra 4700 ft; RMNH 8986, 8988 and 8907 from Nong Kodjajar Genger M[ts] ± 1200 m Eastern Java; RMNH 11408 Botanical garden, Buitenzorg, Java; RMNH 14250 A and 14250 B from Poentjakpass, Western Java ± 1000 m; RMNH 8991 from Poentjakpass, Western Java ± 1400m; RMNH 8990 near Bandoeng, Western Java; RMNH 14251 (*A* through *J*) from Apoeran, Wonosobo, above 600 m, Java; RMNH 6981 from near Soekaboemi, Java; RMNH 8613 from near Modjotengrak ± 1100 m Wonosobo; RMNH 14253, through 14258, 14259, 14259 A, 14259 B, 15259 C and 11260 from Tjikadjang, Western Java 900 m; RMNH 14262 Poentjakpass ± 1400 m, Western Java; RMNH 14263 through 14265 Poentjakpass 1500 m, Western Java; RMNH 14261 from Sapoeran, Wonosoba ± 600 m; RMNH 1557 Java (labeled as "cotype"); RMNH 1558 (two specimens, a large female and a juvenile also labeled as cotypes); RMNH 8504 Wonosoba, Java ± 1000 m; RMNH 7259 A, 7259 B and 7259 C from Kali Baroe Bandjoewang, Java; RMNH 14266 A and 14266 B from Wonosoba, Java ± 600 m; RMNH 8416 A, 8416 B, 8416 C and 8416 D, from top of Megamindoeng, Java; RMNH 14267 from below Ardjoena, South of Goenoeng Papadjan, east Priangan, Western Java ± 1000m; RMNH 14269 through 14274 from Tjikadjang, Western Java; NHRS 3174 (21); 3174 (56); 3174 (44); 3174 (58); 3174 (52); 3174 (59); 3174 (1); 3174 (3); 3174 (57); 3174 (55) and 3174 (50) from Pagilaroe, Java; NHRS 2926 from Siti Ardao, Java; RMNH 14275 (1118), 14276 (925), 14277 (812) and 14278 (552) from Tjikadjang 900 m, Western Java; RMNH 14279 and 14280 from Soemba Doerer near Malang; RMNH 14281 Padang; 14282 from Poespo; RMNH 14283, 14284, 14285 and 14286 from Poentjak Gedeh M[ts], Western Java; RMNH 14287 through 14299 (embr.) from Garoet, Western Java ± 1500 m; RMNH 14300 and 14301 from Garoet, Western Java ± 1500 m; NHRS 2926 from Siti Ardao Java.

*RESUMO* — Redescrição de *Trimeresurus brongersmai* Hoge 1969 e comparação com: *T. puniceus* (Boie) 1827; *T. cornutus* Smith 1930; *T. kanburiensis* Smith 1943 e *T. borneensis* (Peters) 1872 que é considerado como uma espécie válida.

*UNITERMOS* — *Trimeresurus brongersmai* Hoge 1969; *T. puniceus* (Boie) 1827; *T. cornutus* Smith 1930; *T. kanburiensis* Smith 1943 e *T. borneensis* (Peters) 1872.

## ACKNOWLEDGMENTS

I would like to extend my most sincere thanks to the following persons who permitted me access to the specimens in their care: Alice Grandison, British Museum (Natural History), London; L. D. Brongersma,





Rijksmuseum v. Natuurlijke Historie, Leiden; the late Doris M. Cochran and James A. Peters, United States National Museum, Washington DC.; Jean Guibé, Museum d'Histoire Naturelle, Paris; Hjalmar Rendahl and Greta Vestergren, Naturhistoriska Riksmuseum Stockholm: Ralph Grantsan for fig. 1, 2, 3, 7, 8 and 9.

## LITTERATURE

BOETTGER, O. — Listen von Kriechtieren und Lürchen aus dem tropischen. Asien u. aus Papuasien. *Ber. u. Thât Offenbacher Ver. für Naturk.*:65-155.1892

BOIE, F. — Bemerkungen ü. Merrem's Versuch eines Systems der Amphibien. in *Isis v. Oken* *20*:508-566.1827

BOULENGER, G. A. — Catalogue of Snakes in the British Museum (Natural History) London *3*:XIV + 727, 37 text fig, 25 pl. 1896

DUMÉRIL, A. M. C., BIBRON G. et DUMÉRIL A. — Erpétologie Générale ou Histoire Naturelle complète des Reptiles *7*(2) XII + : 781-1535.1854

HOGE, A. R. — Um novo *Trimeresurus* de Simalur [Serpentes Viperidae]. *Ciência e Cultura* *21*(2):459-460, 1969

LEVITON, A. E. — The venomous Terrestrial Snakes of Eeast Asia, India, Malaya and Indonesia: 529-576 in Venomous Animals an their Venoms *1* Venomous Vertebrates XVIII +: 707. 1968

PETERS, W. — Übersicht der von den Herren Ms. G. Doria und Dr. O. Beccari in Sarawak auf Borneo von 1865 bis 1868 Gesammelten Amphibien. *Ann. dei Mus Civico di Stor. Natur. di Genova* *3*:27-45. 1872.

SCHLEGEL, H. — Essai sur la physionomie des Serpens *2*:1-606 + Atlas 1837 La Haye

SMITH, M. A. — Two new Snakes from Tonkin Indo-China, *Ann. Mag. Nat. Hist.* (10)6: 681-3 text fig., 1930

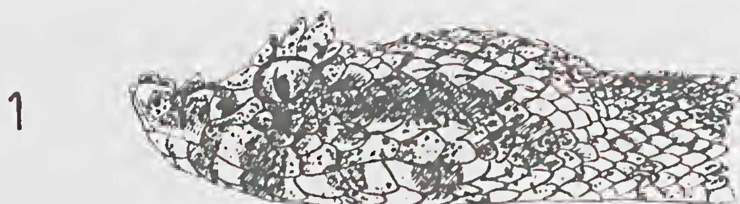
SMITH, M. A. — The Fauna of British India, Ceylon and Burma, including the whole of the Indo-Chinese Sub. region *3* Serpents. London 1943
(Reprinted by the Survey of India Press Dehra Dun 1961)

VAN LIDTH DE JEUDE, Th. W. — Note XXXIV on Reptiles from North Borneo. *Notes Leyden Mus.* *15*: 250-257. 1893

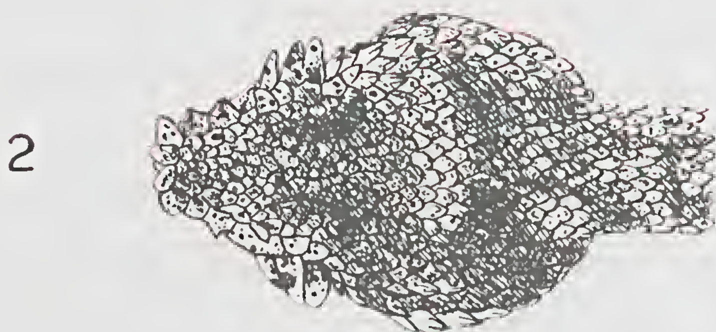




1



2



3



Fig. 1 — *Trimeresurus brongersmai* USNM 30758
Fig. 2 — *Trimeresurus brongersmai* USNM 30758
Fig. 3 — *Trimeresurus brongersmai* IB 29925

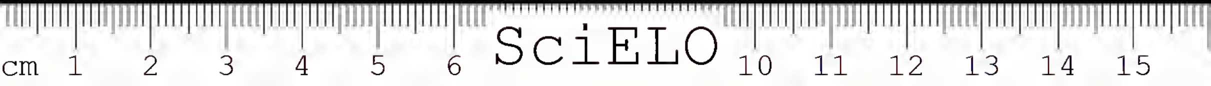
4

5

6

Fig. 4, 5 e 6 — *Trimeresurus cornutus* MNHNP 1937-35





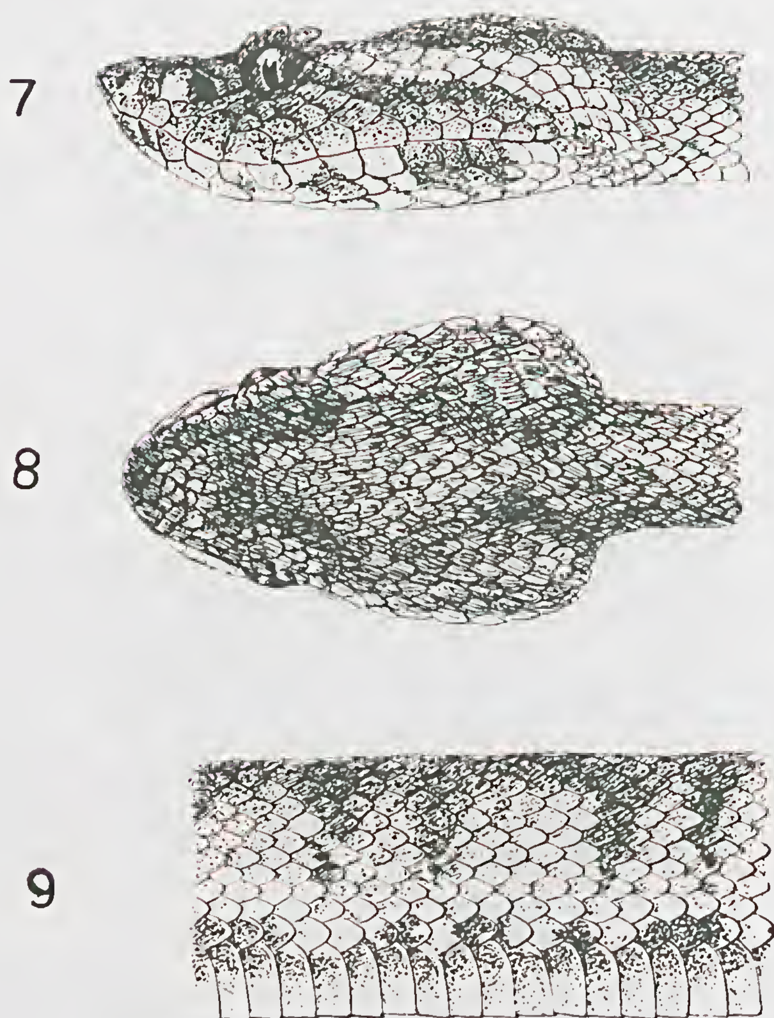
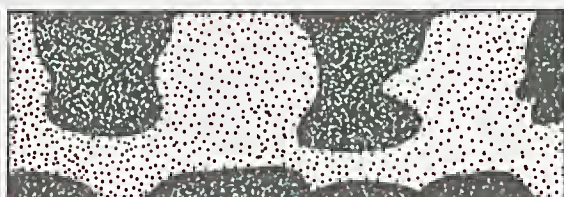
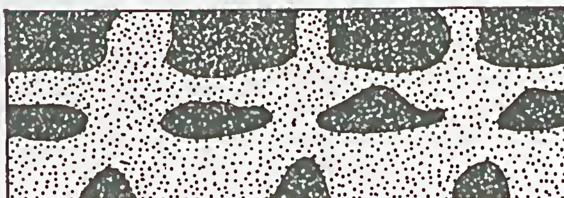



Fig. 7, 8 e 9 — *Trimeresurus puniceus* IB 29926

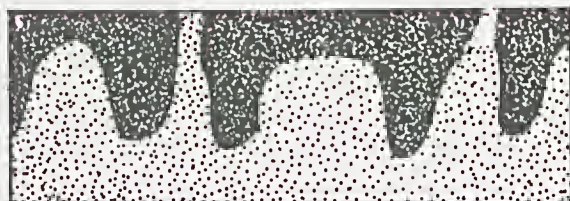
10



11

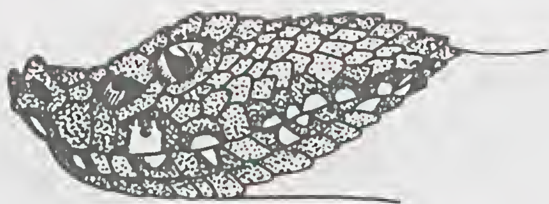


12



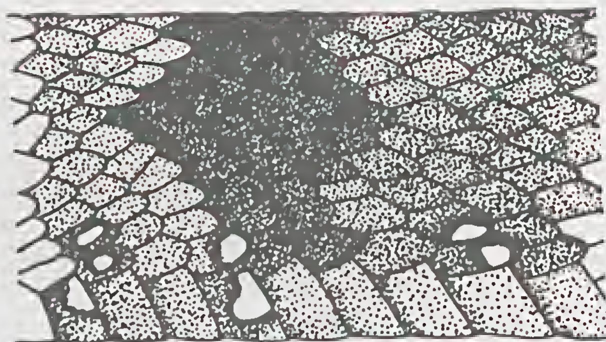
Schematic pattern of:
Fig. 10 — *T. borneensis*
Fig. 11 — *T. brongersmai*
Fig. 12 — *T. puniceus*

13



1 cm.

14



1 cm.

Fig. 13 e 14 — *Trimeresurus borneensis* BMNH 92-6-3-10

Mem. Inst. Butantan
38: 159-162, 1974

# NOTA PRÉVIA
# OBTENÇÃO EXPERIMENTAL DO QUADRO ANÁTOMO--PATOLÓGICO DA PANCREATITE HEMORRÁGICA AGUDA NO CÃO PELA INOCULAÇÃO DE VENENO DE *TITYUS SERRULATUS*

JESUS CARLOS MACHADO *
e
JOSÉ FRANCO DA SILVEIRA FILHO **

Seção de Anatomia Patológica do Instituto Butantan

*UNITERMOS* — Pancreatite hemorrágica aguda; veneno escorpiônico.

Waterman, 1938, relatou a ocorrência de numerosos casos de Pancreatite Hemorrágica Aguda em acidentes humanos provocados pelo escorpião *T. trinitatis*. Bartholomew, 1970, em outra série de relatos de acidentes humanos pelo mesmo escorpião, confirma a grande freqüência desta pancreatite aguda, comprovadas por análises clínicas, laboratoriais e laparotomias.

A partir dessa observação clínica dos acidentes humanos, procuramos reproduzir experimentalmente em nosso laboratório este processo, a partir desse veneno.

Verificamos em nossos trabalhos iniciais que o veneno escorpiônico de *T. serrulatus* induz alterações patológicas no pâncreas do cão que vão desde degenerações microvacuolares das células acinares até àquelas características do quadro anátomo-patológico da pancreatite aguda. Julgamos oportuno publicar, desde logo, em nota prévia, esses primeiros achados que reputamos interessante, no sentido de se obter este modelo biológico da patologia pancreática, a partir do veneno escorpiônico. A tabela I mostra os resultados iniciais obtidos em cães inoculados intravenosamente com o veneno total (conseguido por extração elétrica) de *T. serrulatus*.

A potencialidade de veneno usado era de 500 gamas, dose mínima mortal para cobaias de 500 gramas.

Os 8 animais inoculados com doses de 0,5-1,0 mg de veneno por kg peso corpóreo morreram em menos de 4 horas após a inoculação. Estes animais apresentaram fortes sinais de intoxicação 10 minutos após a inoculação do veneno: salivação, respiração difícil, evacuação, sudorese, vômitos, tremores contínuos, lacrimação, ficando o animal totalmente prostrado.

---

* Diretor da Divisão de Patologia do Instituto Butantan.
** Bolsista do F.E.D.I.B. (Bolsa Aperfeiçoamento I).

Endereço para correspondência:
C.P. 65 — 05504 — São Paulo — Brasil.





A análise histopatológica do pâncreas destes animais mostra degenerações vacuolares das células acinares e pequenas hemorragias nos septos interlobulares.

Doses menores (0,05 — 0,09 mg de veneno/kg. peso) também causam sinais de intoxicação logo após a sua inoculação, embora, em menor intensidade do que no caso das doses maciças (0,5 — 1,0 mg). Vinte quatro horas após a inoculação do veneno os sinais de intoxicação são pouco acentuados. Os animais eram sacrificados 24 horas após a inoculação do veneno.

A análise histopatológica do pâncreas destes animais mostra alterações mais acentuadas do que no caso anterior. Provavelmente, neste último caso o veneno teve mais tempo para agir.

Em um animal tratado com 3 doses intercaladas (24 horas em 24 horas) de veneno de 0,08 mg/kg peso apresentou além de degenerações nas células acinares, fortes hemorragias nos septos inter e intralobulares.

Um animal inoculado com uma única dose de veneno de 0,05 mg de veneno / kg peso, apresentou quadro típico da pancreatite hemorrágica aguda, constituída por alterações de necrose do tecido adiposo, e de áreas parenquimatosas, ao lado de hemorragias interlobulares e lobulares.

TABELA I

N.º de cães, doses de veneno escorpiônico de *T. serrulatus* inoculado intravenosamente em cães. (Veneno total obtido por extração elétrica) e aspectos anatomopatológicos.

| N.º CÃES | VENENO Mg/Kg de peso corpóreo | HISTOPATOLOGIA |
|---|---|---|
| 4 | 1,00 | — Degenerações microvacuolares das células acinares pancreáticas<br>— Pequenas hemorragias nos septos interlobulares<br>— Ácinos pancreáticos normais carregados de grânulos de zimogênio |
| 1 | 0,90 | Idem |
| 3 | 0,50 | Idem |
| 2 | 0,09 | Idem |
| 2 | 0,08 | Idem |
| 1 | 0,05 | Pancreatite hemorrágica aguda |

OBS.: Não constam da tabela I, 2 animais que receberam 3 doses intercaladas (24 horas em 24 horas) de veneno escorpiônico de 0,08 mg por Kg de peso corpóreo. Em um dos animais além das degenerações microvacuolares encontramos fortes hemorragias nos septos intra e interlobulares.

MACHADO, J. C. & SILVEIRA F.º, J. F. — Obtenção experimental do quadro anátomo-patológico da pancreatite hemorrágica aguda no cão pela inoculação de venenos de *Tityus serrulatus*.

*Mem. Inst. Butantan, 38*: 159-162, 1974.

Completa o quadro exsudato redondo celular rico em polimorfonucleares e fenômeno de trombose vascular.

Por suas propriedades farmacológicas e bioquímicas o veneno escorpiônico parece constituir-se em uma preciosa ferramenta para o estudo da etiopatogenia da pancreatite aguda.

Objetivamos, à partir desses achados iniciais, padronizar um método de indução de pancreatite aguda no cão, usando o veneno de *T. serrulatus* inoculando uma série maior de animais com a dose ideal acima referida. Concomitantemente, pretendemos achar a eventual participação da acetilcolina e/ou adrenalina na fisiopatologia da pancreatite hemorrágica aguda.

*UNITERMS* — Acute hemorrhagic pancreatitis; Scorpionic venom.

BIBLIOGRAFIA

1. BARTHOLOMEW, C. — "Acute scorpion Pancreatitis in Trinidad", *British Medical Journal, 1*:666-668, 1970.

2. WATERMAN, J. A. — "Some notes on scorpion poisoning in "Trinidad", *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 31* (6):607-624, 1938.

Recebido para publicação em 17-V-1974 e aceito em 10-X-1974.





MACHADO, J. C. & SILVEIRA F.º, J. F. — Obtenção experimental do quadro anátomo-patológico da pancreatite hemorrágica aguda no cão pela inoculação de venenos de *Tityus serrulatus*.

*Mem. Inst. Butantan*, *38*: 159-162, 1974.

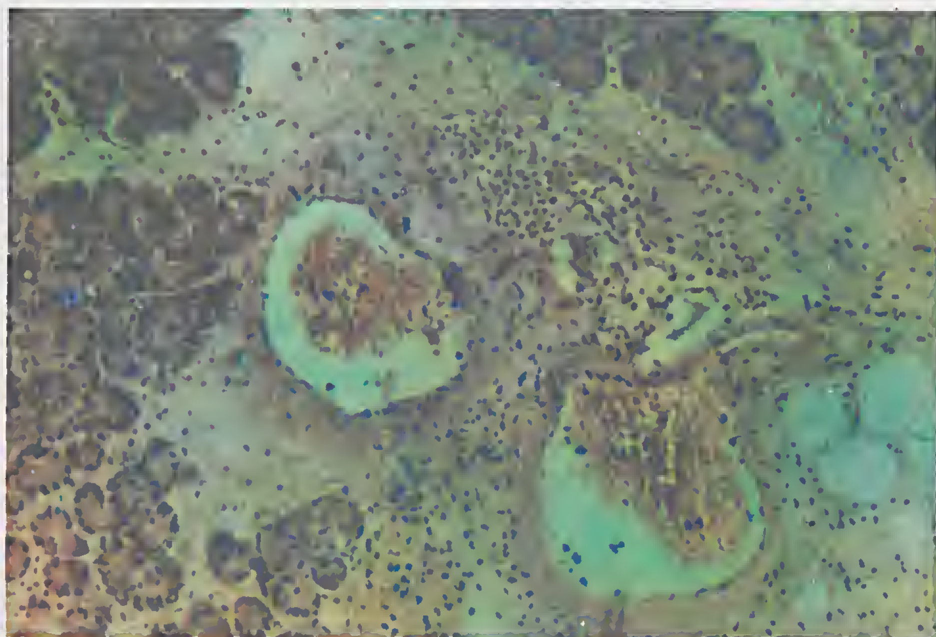


Fig. 1 — *Pâncreas*: H.E. Necrose vascular com trombose e intenso edema e exsudato redondo celular inflamatório com focos hemorrágicos.

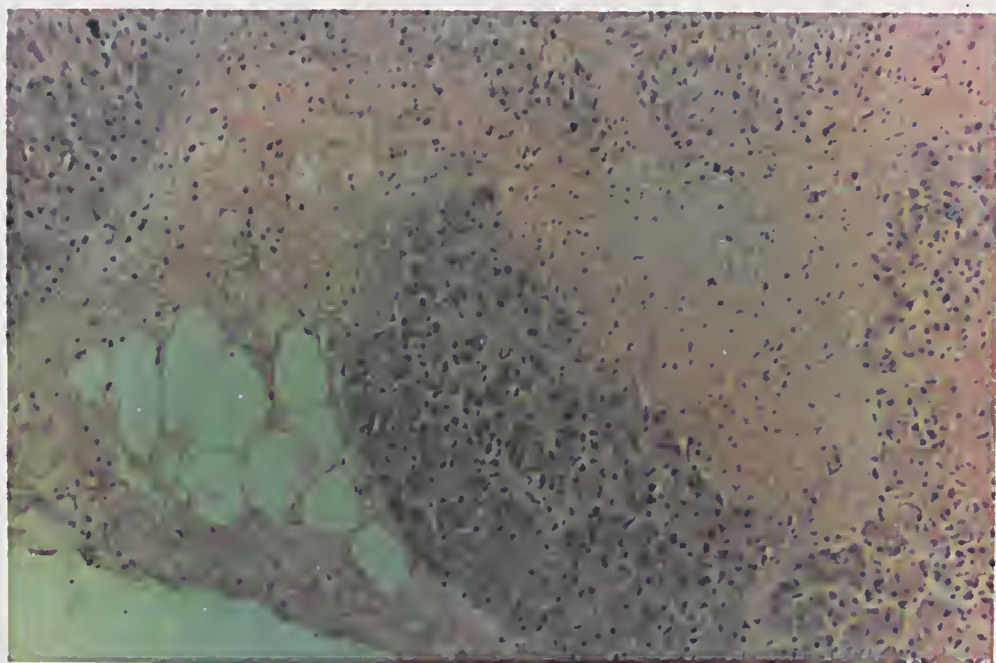


Fig. 2 — *Pâncreas*: H.E. Forte hemorragia do estroma fibroso com lesões degenerativas do tecido adiposo e parenquimatoso.

Mem. Inst. Butantan
38: 163-166, 1974

# NOTA PRÉVIA
# OBTENÇÃO DE CULTURA DE LINFOMAS HUMANOS — TUMOR DE BURKITT***

JESUS CARLOS MACHADO *
e
LEONOR DENARO **

*UNITERMOS* — Tumor de Burkitt: Cultura.

Os autores vêm realizando o estudo de tumores do tecido linforeticular, no que se refere às peculiaridades do seu cultivo "in vitro", às características ultra-estruturais de suas células e aos efeitos por eles causados em tecidos normais.

Iniciamos nossos estudos através do linfoma de Burkitt, um neoplasma maligno do sistema linforeticular, mais especificamente denominado LINFOMA MALIGNO INDIFERENCIADO, tipo Burkitt (Berard et al., 1969).

A singularidade desse linfoma é a sua provável correlação etiológica com um agente viral, correlação essa já levantada por O'Connor em 1961, tendo o autor verificado a peculiar distribuição geográfica e climática do tumor.

As células predominantes e características da massa tumoral são células linforeticulares linfoblastóides indiferenciadas.

Sob as condições mais favoráveis de cultivo, células normais da série linfocítica não conseguem ser mantidas "in vitro" senão por alguns dias (Bichel, 1952 e Trowell, 1958).

Epstein e Barr, 1965, referindo-se à habilidade de crescimento das células do linfoma de Burkitt, em culturas permanentes, levantam a hipótese de que esse potencial, que parece ser um atributo específico dos linfoblastos do tumor de Burkitt, diferindo-os de outros linfoblastos humanos, esteja conectado com a presença de um vírus em suas células.

Na presente nota, apresentamos alguns aspectos do referido tumor, em cultura mantida em nosso laboratório (CP-7), por um período superior a 4 meses.

Fig. 1 — Aspecto do rosto de uma criança, de 5 anos de idade, L A.P.F.º., portador de um tumor, na mandíbula direita.

---

* Diretor da Divisão de Patologia do Instituto Butantan.

** Assistente Responsável pelo Laboratório de Citopatologia da Divisão de Patologia do Instituto Butantan.

*** Este trabalho foi comunicado na Reunião Regional da Seção Sul da Sociedade Brasileira de Patologistas — 1973.

**** Este trabalho está sendo realizado com o auxílio do CNPq e FEDIB.

Endereço para correspondência:
C.P. 65 — 05504 — São Paulo — Brasil.

Fig. 2 — Aspecto da massa tumoral, na cavidade oral, tomando toda a bochecha direita e assoalho da boca.

Fig. 3 — Aspecto histológico do tumor, caracterizado pela presença monótona de linfoblastos neoplásicos, monotonia esta quebrada pela presença de macrófagos normais, dando ao quadro o aspecto típico denominado de "céu estrelado". Coloração Hematoxilina Eosina. ± 1000X.

Fig. 4 — Aspecto do tecido tumoral, esmagado entre lâmina e lamínula. Note-se a marcante vascularização do tecido, sendo os capilares neoformados muitas vezes ramificados, contendo hemácias no seu interior. Coloração Giemsa. ± 1000X.

Fig. 5 — Célula epitelial. Preparação obtida por esmagamento do tecido tumoral entre lâmina e lamínula. Coloração Giemsa. ± 1000X.

Figs. 6 e 7 — Células linfoblastóides, em cultura. Núcleo ocupando grande parte do volume celular, com forma ovóide ou em "pera". Citoplasma limitando-se a uma pequena faixa periférica. Note-se a presença de característicos vacúolos intra-citoplasmáticos, possivelmente devidos à inclusão de material lipídico. Colorações Mallory e Hematoxilina-Eosina. ± 1000X.

Fig. 8 — Célula mostrando a presença de 2 núcleos, parecendo indicar a ocorrência de mitose parcial anômala. Coloração Giemsa. ± 1000X.

É importante notar que essas células, em cultura, crescem em suspensão, sem aderirem às paredes do frasco.

Esses aspectos, tanto do comportamento "in vitro", quanto da morfologia das células fixadas, correspondem realmente àqueles descritos por outros autores, com relação ao cultivo de células do tumor de Burkitt (Epstein e Barr, 1964; Pulvertaft, 1964; Epstein e Barr, 1965; Stewart et al., 1965).

*UNITERMS* — Burkitt Tumor: culture.

## BIBLIOGRAFIA

1. BERARD, C.; O'CONNOR, G. T.; THOMAS, L. B. and TORLONI H. — Histopathological definition of Burkitt's tumour. *Bulletin of the World Health Organization 40*, 4: 601-607, 1969.
2. BICHEL, J. — Cultivation of leukemic cells in tissue culture. *Acta Path. Microbiol. Scand. 31*:410-419, 1952.
3. EPSTEIN, M. A. and BARR, Y. M. — Cultivation "in vitro" of Human lymphoblasts from Burkitt's malignant lymphoma. *Lancet 1*:252-253, 1964.
4. EPSTEIN, M. A. and BARR, Y M. — Characteristics and mode of growth of a tissue culture strain (EB1) of Human lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *J. N. Cancer Inst. 34*, 2:231-240, 1965.
5. PULVERTAFT, R. J. V. — Vytology of Burkitt's tumor (African Lymphoma). *Lancet, 1*:238-240, 1964
6. STEWART, S. E.; LOVELACE, E.; WHANG, J. J. and NGU, V. A. — Burkitt tumor: Tissue culture, cytogenetic and virus studies. *Jour. Natl. Cancer Inst. 34*:319-327, 1965.
7. TROWELL, O. A. — The lymphocyte. *Int. Rev. Cytol. 7*:257, 1958.

Recebido para publicação em 30-V-1974 e aceito em 10-X-1974.

MACHADO, J. C. & DENARO, L. — Obtenção de culturas de linfomas humanos — Tumor de Burkitt.
*Mem. Inst. Butantan, 38*: 163-166, 1974.



Figura 1



Figura 2

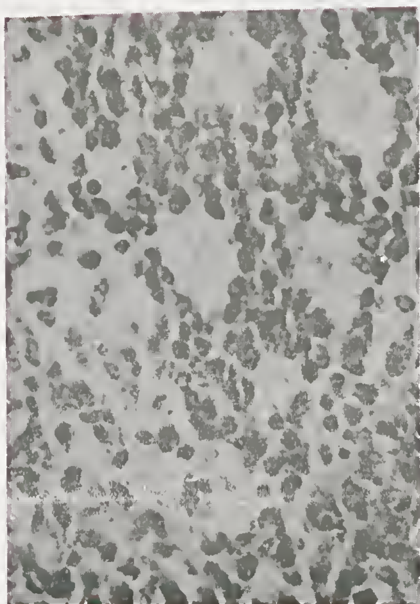


Figura 3



Figura 4



Figura 5



Figura 6 e 7

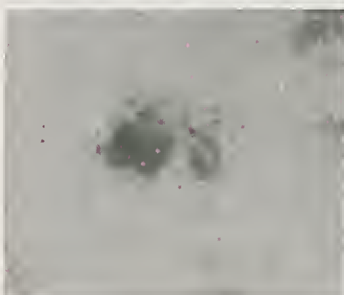


Figura 8

Mem. Inst. Butantan
38: 167-178, 1974

# NOTA PRÉVIA

# LISTA DAS ESPÉCIES DE SERPENTES COLETADAS NA REGIÃO DA USINA HIDROELÉTRICA DE ILHA SOLTEIRA — BRASIL

ALPHONSE RICHARD HOGE *
S. ALMA R. W. DE L. ROMANO *
PEDRO ANTONIO FEDERSONI JUNIOR **
CARMEM LÚCIA DOS SANTOS CORDEIRO **

(Secção de Herpetologia do Instituto Butantan — São Paulo — Brasil)

*RESUMO* — Nota prévia sobre as espécies de serpentes coletadas na região da represa da Usina Hidroelétrica de Ilha Solteira, São Paulo, Brasil. 30 espécies identificadas até o momento.

*UNITERMOS* — Nota prévia sobre as espécies de serpentes coletadas na região da represa da Usina Hidroelétrica de Ilha Solteira, São Paulo, Brasil.

Aproveitando a elevação gradual das águas do Rio Paraná, motivada pelo fechamento das comportas da Barragem da Usina Hidroelétrica de Ilha Solteira, a Secção de Herpetologia do Instituto Butantan, em colaboração com a C.E.S.P. (Centrais Elétricas de São Paulo), coletou grande número de espécimes, durante o período de 14 de abril de 1973 a 5 de setembro de 1973.

A região, ao montante da barragem, afetada pelas águas naquela oportunidade, compreendia, inclusive ilhas fluviais, que com a formação do "lago" artificial, desapareceram completamente.

A área total, se apresenta nas imediações das coordenadas 51°W e 20°S.

Os exemplares foram coletados nas margens do Rio Paraná, em suas antigas ilhas, nas margens de seus afluentes e principalmente em árvores semi-submersas de suas margens (tais árvores constituíram uma média de 95% dos locais de coleta).

Considerando que o estudo do material coletado (vários milhares de exemplares), levará um tempo considerável, achamos útil a publicação preliminar de uma nota, com uma simples lista provisória das espécies coletadas na região.

Foram encontradas as seguintes espécies:

FAMÍLIA *Boidae*

SUBFAMÍLIA *Boinae*

* Bolsa do Conselho Nacional de Pesquisas — CNPq.
** Bolsa do Fundo Especial de Despesas do Instituto Butantan — F.E.D.I.B.

Endereço para correspondência:
C.P. 65 — 05504 — São Paulo — Brasil.





*Boa constrictor amarali* (Stull)

1932 *Constrictor constrictor amarali* Stull, Occ. Pap. Boston Soc. Nat. Hist., *8*:27.

1951 *Boa constrictor amarali;* Forcart, Herpetologica, *7*:199.
*Localidade tipo*: — São Paulo, Brasil.
*Distribuição*: — Brasil: sul e sudoeste. Bolívia: sudeste.

*Epicrates cenchria crassus* (Cope)

1862 *Epicrates crassus* Cope, Proc. Acad. Nat. Sci. Phila., *1862*:349

1929 *Epicrates cenchria crassus;* Amaral, Mem. Inst. Butantan, *4*:140
*Localidade tipo*: — Cadosa, Rio Paraná, Paraguai.
*Distribuição*: — Região sul do Brasil. Paraguai e norte da Argentina.

*Eunectes murinus murinus* (Linnaeus)

1758 *Boa murina* Linnaeus, Systema Naturae, Ed. *10*:215.

1936 [*Eunectes murinus*] *murinus;* Dunn e Connant, Proc. Acad. Nat. Sci. Phila., *88*:503.
*Localidade tipo*: — "América".
*Distribuição:* — Desde a Bacia Amazônica, em direção ao sul, até o Rio Paraná e afluentes.

## FAMÍLIA *Colubridae*

### SUBFAMÍLIA *Colubrinae*

*Apostolepis assimilis* (Reinhardt)

1861 *Elapomorphus assimilis* Reinhardt, Vid. Meddel. Naturch. For. Kjobenhavn, *1860*:235, pl.-4, figs. 1-5.

1896 *Apostolepis assimilis;* Boulenger, Cat. Sn. Brit. Mus., *3*:234
*Localidade tipo:* — Minas Gerais, Brasil.
*Distribuição:* — Brasil: regiões central e sul. Chaco Argentino.

*Chironius bicarinatus* (Wied)

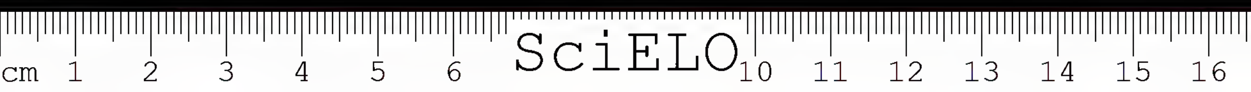
1820 *Coluber bicarinatus* Wied, Reise nach Brasilien, *1*:181.

1955 *Chironius bicarinatus;* Bailey, Occ. Pap. Mus. Zool. Univ. Mich., *571*:8.

*Localidade tipo:* — Lago próximo ao Rio Jucu, cinco léguas ao sul da Cidade de Espírito Santo, Estado de Espírito Santo, Brasil.

*Distribuição:* — Brasil: Espírito Santo, leste de Minas Gerais, noroeste de São Paulo e sul de Mato Grosso. Argentina: sudoeste de Missiones e Rio Uruguai, Províncias de Chaco, Corrientes, Salta, Formosa e Entre Rios. Noroeste do Uruguai.





*Chironius flavolineatus* (Boettger)

1885 *Herpetodryas flavolineatus* Boettger, Zeitz. für Naturwiss., *58*:234.

1955 *Chironius flavolineatus;* Bailey, Occ. Pap. Mus. Zool. Univ. Mich., *571*:13.
*Localidade tipo:* — Paraguai
*Distribuição:* — Brasil: savanas do oeste e centro da Bahia, nordeste de Mato Grosso, São Paulo, e também, encontrado na Amazônia, nos campos de Humaitá.

*Chironius quadricarinatus* (Boie)

1827 *Erpetodryas 4 — dricarinatus* Boie, Isis von Oken, *20*(*1*) :548.

1955 *Chironius quadricarinatus;* Bailey, Occ. Pap. Mus. Zool. Univ. Mich., *571*:15.
*Localidade tipo:* — Não determinada; restrita a Assunción, Paraguai, por Bailey, Occ. Pap. Mus. Zool. Univ. Mich., *571*:15.
*Distribuição:* Brasil: áreas de savanas do norte de Mato Grosso e São Paulo. Centro da Bolívia. Centro do Paraguai.

*Clelia occipitolutea* (Duméril, Bibron et Duméril)

1854 *Brachyruton occipito-luteum* Duméril, Bibron et Duméril, Erp. Gén., *7*:1009.

1970 *Clelia accipitolutea;* Bailey, in Peters and Orejas-Miranda, Cat. Neot. Squam. — Part I — Snakes: 64.
*Localidade tipo:* — Desconhecida.
*Distribuição:* — Sul do Brasil, até o Uruguai e Centro da Argentina.

*OBSERVAÇÃO: — Maglio, considerou as espécies de Leimadophis, como Dromicus em: "West Indian Xenodontinae Colubrid Snakes: their probable origin, philogeny and Zoogeography", Bull. Mus. Comp. Zoology, 141* (1) :1-53. 1970.

*Dromicus almadensis* Wagler

1824 *Natrix almadensis* — Wagler, in Spix, Sp. Nov. Serp. Bras.: pl. 10.

1926 [*Leimadophis*] *almadensis;* Amaral, Rev. Mus. Paulista, *15*:78.
*Localidade tipo:* — Proximidades da Bahia, Brasil.
*Distribuição:* — Brasil central, oeste e sul. Paraguai. Argentina. Uruguai.

*Dromicus reginae macrosoma* Amaral

1935 *Leimadophis reginae macrosoma* Amaral, Mem. Inst. Butantan, *9*:238.
*Localidade tipo:* — Canna Brava, Goiás, Brasil.
*Distribuição:* — Brasil: em Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais e São Paulo.

*Drymarchon corais corais* (Boie)

1827 *Coluber corais* Boie, Isis von Oken, *1827*:537.

1899 [*Drymarchon corais corais*]; Stejneger, North Amer. Fauna, *14*:70.
*Localidade tipo:* — América.
*Distribuição:* — Bacia Amazônica e do Paraguai. Da Venezuela até a Argentina. Trinidad e Tobago.

*Helicops carinicaudus infrataeniatus* (Jan)

1865 *H.* [*elicops*] *infrataeniatus* Jan, Arch. Zool. Anat. Fis., *3*:253.

1916 *Helicops carinicauda* var. *infrataeniata;* Griffin, Mem. Inst. Carnegie Mus., *7*:179.
*Localidade tipo:* — "Surinam" (in error) e "Brasile".
*Distribuição:* — Sul do Brasil: Santa Catarina, Rio Grande do Sul, a sudoeste, em São Paulo e Mato Grosso. Uruguai e Argentina.

*Hydrodynastes bicinctus schultzi* Hoge

1966 *Hydrodynastes bicinctus schultzi* Hoge, Ciência e Cultura, São Paulo, *18*:143.
*Localidade tipo:* — Presidente Epitácio, Estado de São Paulo, Brasil.
*Distribuição:* — Bacia do Paraná.

*Hydrodynastes gigas* (Duméril, Bibron et Duméril)

1854 *Xenodon gigas* Duméril, Bibron et Duméril, Erp. Gén., *7*:761.

1966 *Hydrodynastes gigas;* Hoge, Ciência e Cultura, São Paulo, *18*:143.
*Localidade tipo:* — Província de Corrientes, Argentina.
*Distribuição:* — Brasil: ao sul e no Território Federal do Amapá. Bolívia: ao leste. Argentina: ao norte. Paraguai.

*Leptodeira annulata annulata* (Linnaeus)

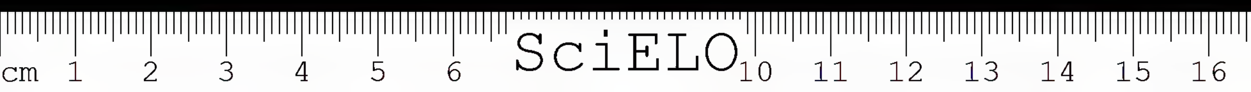
1758 *Coluber annulatus* Linnaeus, Systema Naturae, Ed. *10*:224.

1958 *Leptodeira annulata annulata;* Duellman, Bull. Amer. Mus. Nat. Hist., *114*:47.
*Localidade tipo:* — Bacia Amazônica; restrito por Duellman (l.c.: 48), para: Baixo Rio Amazonas, Pará, Brasil.
*Distribuição:* — Bacia Amazônica: desde a Venezuela, abaixo de 1.100 m de altitude; Equador; Peru e Bolívia, até a foz do Amazonas. Ao longo da Costa Atlântica, até São Paulo e Mato Grosso.

*Leptophis ahaetulla marginatus* (Cope)

1862 *Thrasops marginatus* Cope, Proc. Acad. Nat. Sci. Phila., *1862*:349.





1958 *Leptophis ahaetulla* [*marginatus*]*;* Int. Comm. Zool. Nomen., Op. *524*:270.
*Localidade tipo:* — Paraguai.
*Distribuição:* — Desde o sudeste da Bolívia, até o sul do Brasil. Paraguai. Norte da Argentina.

*Liophis brazili* (Amaral)

1923 *Rhadinaea brazili* Amaral, Proc. New England Zool. Club, *7*:87.

1926 *Liophis brazili;* Amaral, Arch. Mus. Nacional Brazil., *26*:9, pl. 1, figs. 4-6.
*Localidade tipo:* — Júlio Pontes, São Paulo, Brasil.
*Distribuição:* Brasil: Mato Grosso e São Paulo.

*Liophis joberti* (Sauvage)

1884 *Enicognathus Joberti* Sauvage, Bull. Soc. Philom. Paris, *(7) 8*:146.

1958 *Liophis joberti;* Hoge, Pap. Avul. Depto. Zool. São Paulo, *13*:223.
*Localidade tipo:* — Ilha de Marajó, Pará, Brasil.
*Distribuição:* — Brasil: ao longo da costa, desde o Pará até o Rio de Janeiro, e Brasil Central, do Mato Grosso ao Ceará. Bolívia e Paraguai.

*Lygophis lineatus meridionalis* (Schenkel)

1901 *Aporophis lineatus* var. *meridionalis* Schenkel, Verh. Naturforch. Ges. Basel, *13* (*1900*) :160.

1952 *Lygophis lineatus meridionalis;* Hoge, Mem. Inst. Butantan, *24 (1952)* :252, fig. 3.
*Localidade tipo:* — "Mte. Sociedad", Bemalcue, Paraguai.
*Distribuição:* — Brasil sul. Paraguai. Norte da Argentina.

*Mastigodryas bifossatus bifossatus* (Raddi)

1820 (1822) *Coluber bifossatus* Raddi, Mem. Soc. Italiana Sci. Moderna, *18*:333.

1970 *Mastigodryas bifossatus bifossatus;* Peters and Orejas-Miranda, Cat. Neot. Squam. — Part I — Snakes: 192.
*Localidade tipo:* — Rio de Janeiro, Brasil.
*Distribuição:* — Brasil: do Rio de Janeiro e Minas Gerais, até o Rio Grande do Sul. Uruguai.

*Oxyrhopus petola digitalis* (Reuss)

1834 *Coluber digitalis* Reuss, Mit. Senckenb. Naturforsch Ges., *1*:148, pl. 9, fig. 1.





1970 *Oxyrhopus petola digitalis;* Bailey, in Peters and Orejas-Miranda, Cat. Neot. Squam — Part I — Snakes: 233.

*Localidade tipo:* — Ilhéos, Brasil.

*Distribuição:* — Partes Amazônicas do norte da Bolívia, Peru e Equador. Brasil: costeiro e central, nas regiões da floresta. Região do Chocó da Colômbia e leste do Panamá.

*Oxyrhopus trigeminus* Duméril, Bibron et Duméril.

1854 *Oxyrhopus trigeminus* Duméril, Bibron et Duméril, Erp. Gén., *7*:103.

*Localidade tipo:* — Bahia e Rio de Janeiro, Brasil.

*Distribuição:* — Brasil: do norte do Rio de Janeiro até o Rio Amazonas, e a oeste, até o Mato Grosso; Ilha de Marajó.

*Philodryas olfersii* (Lichtenstein)

1823 *Coluber Olfersii* Lichtenstein, Verzeichneiss der Doubetten des Zoologischen der Königl. Universität zu Berlin: 104.

1896 *Philodryas olfersii;* Boulenger, Cat. Sn. Brit. Mus., *3*:129.

*Localidade tipo:* — Brasil.

*Distribuição:* — Oeste do Brasil. Leste do Peru, até a Bolívia. Paraguai. Argentina. Uruguai.

*Philodryas patagoniensis* (Girard)

1857 *Callirhinus patagoniensis* Girard, Proc. Acad. Nat. Sci. Phila., *1857*:182.

1964 *Philodryas patagoniensis;* Hoge, Mem. Inst. Butantan, *30*:67.

*Localidade tipo:* Foz do Rio Negro, Patagônia, Argentina.

*Distribuição:* — Brasil. Bolívia. Paraguai. Argentina. Uruguai.

*Pseudoboa nigra* (Duméril, Bibron et Duméril)

1854 *Scytale neuwiedi* var. *Nigrum* Duméril, Bibron et Duméril, Erp. Gén., *7*:1002.

1962 *Pseudoboa nigra;* Bailey, Bull. Zool. Nomen., *19*(3) :164.

*Localidade tipo:* — Bahia, Brasil.

*Distribuição:* — Nordeste do Brasil, até o leste do Pará; ao sul do Estado do Rio de Janeiro e São Paulo; para oeste, até o noroeste do Mato Grosso. Bolívia central. Argentina: do sul ao norte de Corrientes.

*Thamnodynastes rutilus* Prado

1942 *Dryophilax rutilus* Prado, Ciência, México City, *3*:204, fig. 1-2.

1948 *Thamnodynastes rutilus;* Vanzolini, Rev. Brasil. Biol., *8*:382.
*Localidade tipo:* — Gália, Estado de São Paulo, Brasil.
*Distribuição:* — Estado de São Paulo e Mato Grosso, Brasil.

*Thamnodynastes sp.*

*Xenopholis undulatus* (Jensen)

1900 *Oxyrhopus undulatus* Jensen, Vidensk. Medd. Naturhist. Foren Kjöbenhavn, *1899(1900)*:106, fig. 2.

1975 *Xenopholis undulatus;* Hoge e Federsoni Jr., Mem. Inst. Butantan, *37*: fig. 1-16.
*Localidade tipo:* — Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil.
*Distribuição:* — Brasil: Paraná, São Paulo, Mato Grosso, Goiás e Minas Gerais. Paraguai.

*Waglerophis merremi* (Wagler)

1824 *Ophis merremi* Wagler, in Spix, Sp. Nov. Serp. Braz.: 47, pl. 14.

1973 *Waglerophis merremi*; Romano e Hoge, Mem. Inst. Butantan, *36:* 209.
*Localidade tipo:* — Bahia, Brasil.
*Distribuição:* — Brasil. Bolívia. Paraguai. Norte e centro da Argentina.

SUBFAMÍLIA *Dipsadinae*

*Sibynomorphus mikanii mikanii* (Schlegel)

1837 *Dipsas mikanii* Schlegel, Essai Physionom. Serpens, *2*:277

1960 *Sibynomorphus mikanii mikanii;* Peters, Misc. Publ. Zool. Univ. Mich., *114*:148.
*Localidade tipo:* — Brasil.
*Distribuição:* — Sudeste do Brasil, não incluindo áreas costeiras, com exceção do norte; nos Estados de Mato Grosso, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul e São Paulo.

*FAMILIA Elapidae*

SUBFAMÍLIA *Elapinae*

*Micrurus frontalis frontalis* (Duméril, Bibron et Duméril)

1859 *Elaps frontalis* Duméril, Bibron et Duméril, Erp. Gén., *7*:1223.

1936 *Micrurus frontalis frontalis;* Schmidt, Zool. Ser. Field. Mus. Nat. Hist., *20*:199.
*Localidade tipo:* — Corrientes e Missiones, Argentina.
*Distribuição:* — Brasil sul. Paraguai sul. Incluindo região adjacente da Argentina.





FAMÍLIA *Viperidae*

SUBFAMÍLIA *Crotalinae*

*Bothrops moojeni* Hoge

1966 *Bothrops moojeni* Hoge, Mem. Inst. Butantan, *32(1965)*:126, pl. 4-5, fig. 2.
*Localidade tipo:* — Brasília, Distrito Federal, Brasil.
*Distribuição:* — Brasil, desde o Maranhão, através das savanas do Brasil Central, até o Paraná.

*Crotalus* [*Crotalus*] *durissus collilineatus* Amaral.

1926 *Crotalus terrificus* var. *collilineatus* Amaral, Rev. Mus. Paulista, *15*:90.

1966 *Crotalus durissus collilineatus;* Hoge, Mem. Inst. Butantan, *32* (*1965*) :139, pl. 13.
*Localidade tipo:* — Não especificada na descrição original; restrita, através da designação de um neótipo, para Mato Grosso, Brasil, por Amaral e Hoge, in Hoge, Mem. Inst. Butantan, *32, 1965* (*1966*) :139.

*Distribuição:* — Brasil: Goiás, Distrito Federal, Minas Gerais, nordeste de São Paulo e sudoeste de Mato Grosso.

## COMENTÁRIOS

Embora o material coletado, ainda não tenha sido estudado, devido às suas grandes proporções, chamamos a atenção para o pequeno número de espécies de serpentes peçonhentas coletadas. Somente uma espécie de *Micrurus;* uma espécie de *Bothrops* e uma espécie de *Crotalus.*

Faz-se digno de nota, a ausência total de *Bothrops alternatus, Bothrops jararaca* e *Bothrops neuwiedi*, tão comuns nas zonas próximas da área de captura.

O número de gêneros e espécies coletados, com exceção das peçonhentas, é bastante elevado:

22 gêneros e 30 espécies; de maneira geral, cada um representado por grande número de exemplares. Como exemplo, citamos os gêneros: *Chironius* e *Philodryas*, dos quais foram coletados mais de mil espécimes de cada um; e gênero *Thamnodynastes* e, também, as *Boa constrictor amarali*, com várias centenas de exemplares cada uma.

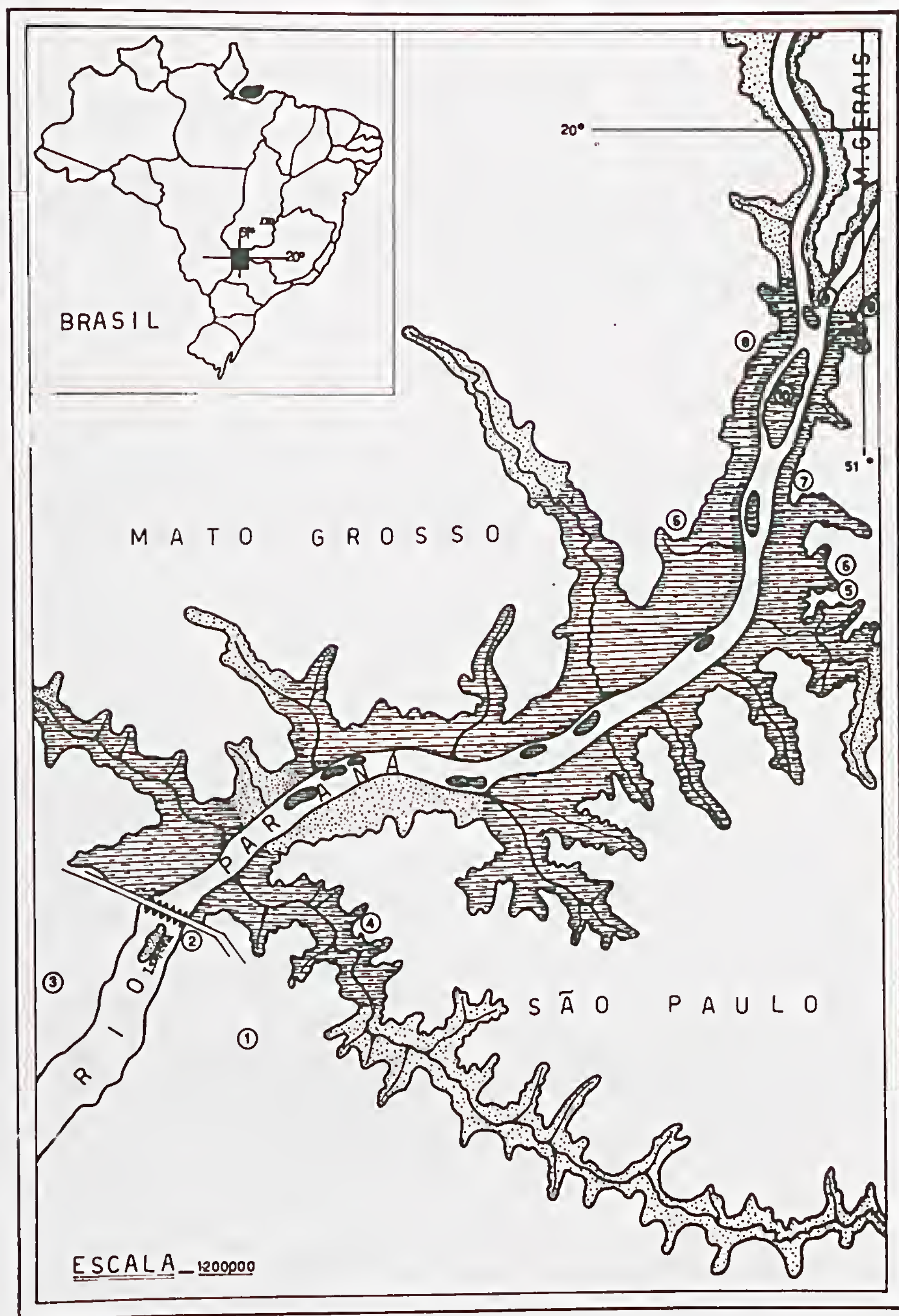
Como era de esperar, o número de exemplares de espécies aquáticas foi reduzido, devido às condições ambientais, que lhes propiciaram a fuga, já que estavam em seu meio de vida normal.

Digna de nota, também, se faz, a coleta de cinco exemplares de *Xenopholis undulatus*, antigo *Paroxyrhopus undulatus* (vide página . . .).

Em trabalho que oportunamente será publicado, daremos detalhadamente a lista dos exemplares e espécies coletados na região.

HOGE, A. R., ROMANO, S. A., FEDERSONI JR., P. A. & CORDEIRO, C. L. S. — Lista das espécies de serpentes coletadas na região da usina hidroelétrica de Ilha Solteira. *Mem. Inst. Butantan, 38*: 167-178, 1974.

Figura I



HOGE, A. R., ROMANO, S. A., FEDERSONI JR., P. A. & CORDEIRO, C. L. S. — Lista das espécies de serpentes coletadas na região da usina hidroelétrica de Ilha Solteira. *Mem. Inst. Butantan, 38*: 167-178, 1974.

MAPA

Figura I — Mapa da região de Coleta

*Legendas das localidades:*

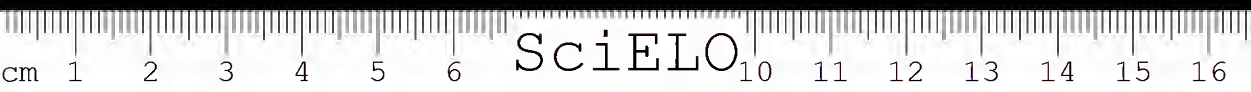
1 — Cidade de Ilha Solteira
2 — Barragem de Ilha Solteira
3 — Cidade de Véstea (Antiga — Nossa Senhora de Guadalupe do Alto Rio Paraná)
4 — Rio São José dos Dourados
5 — Ribeirão da Ponte Pensa
6 — Porto Tabuado (São Paulo e Mato Grosso)
7 — Rubinéia
8 — Porto Itamaraty (São Paulo e Mato Grosso)
9 — Ilha dos Três Estados
10 — Ilha Grande

A região do Rio Paraná, indicada em branco no mapa, representa o rio, antes do enchimento da represa. Os limites externos representam as atuais margens do rio, com a elevação máxima das águas. Tais dados foram fornecidos pela C.E.S.P (Centrais Elétricas de São Paulo).

As partes tracejadas mostram os locais de captura em toda a sua extensão.

As partes pontilhadas, representam as regiões não exploradas por nós, ou exploradas, porém, onde não se encontrou nenhum material durante nossa permanência.





HOGE, A. R., ROMANO, S. A., FEDERSONI JR., P. A. & CORDEIRO, C. L. S. — Lista das espécies de serpentes coletadas na região da usina hidroelétrica de Ilha Solteira. *Mem. Inst. Butantan*, *38*: 167-178, 1974.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Direção Geral das Centrais Elétricas de São Paulo C.E.S.P. — na pessoa do Professor Lucas Nogueira Garcez; ao Sr. João Francisco Aranha, da Administração de Ilha Solteira em São Paulo; à Direção da Usina de Ilha Solteira, representada por Dr. José Roberto Monteiro, engenheiro residente da Obra, por nos ter facilitado o acesso às localidades de captura e por nos ter franqueado o acesso a algumas de suas dependências, na Cidade de Ilha Solteira, como as dependências de sua Unidade Hospitalar, dirigida por Dr. Wanderley Torraca de Almeida, para a instalação de nosso posto de coleta e preparação do material, bem como, agradecemos a colaboração de seus funcionários pela presteza de seus serviços; e de maneira toda especial, ao Sr. Francisco Takahashi, colaborador em todas as explorações feitas e diuturnamente à nossa disposição.

Estendemos nossos agradecimentos:

— à Prefeitura da Cidade de Nova Rubinéia, pela sua acolhida e colaboração.

— à Dra. Jandyra Planet do Amaral, Diretora do Instituto Butantan, pelo apoio prestado às equipes.

— à Diretoria Administrativa do Instituto Butantan; em especial, ao Serviço de Finanças e à Subfrota, pelas facilidades prestadas às equipes.

— ao Sr. João Domingos Cavalheiro, pelos desenhos confeccionados.

Somos gratos também, aos seguintes funcionários e estagiários do Instituto Butantan, que participaram ativamente da captura, durante o período de enchimento da Represa. Em ordem alfabética:

— Arthur Teophilo Martins Filho — Dirceu dos Santos — Helena Ribas Lopes = Estagiária (na época) — Joaquim Cavalheiro — Laerte Paula Santos — Liberato Caetano dos Santos (†) — Luiz Otávio de Assis Melin = Estagiário (na época) — Manoel Caetano — Marcílio Pereira Bueno — Maria Angélica Girotto = Estagiária (na época) — Pedro Nascimento Martins Ferreira — Pedro Villela — Sérgio Branco de Miranda.

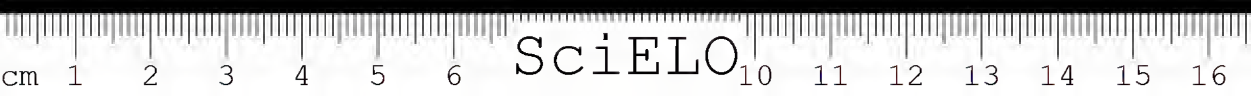
*ABSTRACT* — Preliminary list of snakes collected in the "Ilha Solteira" region São Paulo, Brasil. Till now 30 species are identified.

*UNITERMS* — Preliminary list of snakes collected in the "Ilha Solteira" region, São Paulo, Brasil.

Recebido para publicação em 17-V-1974
Aceito para publicação em 10-X-1974





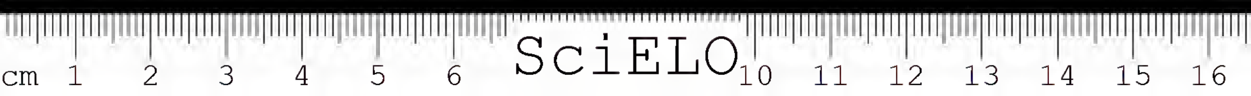

cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15 16

## ÍNDICE DE AUTORES







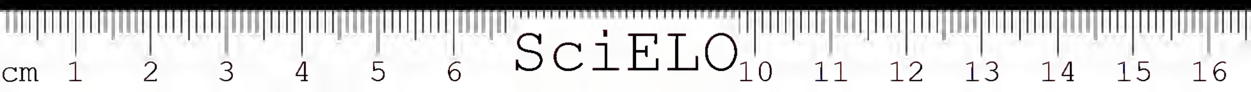

cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15 16

# ÍNDICE DE ASSUNTOS

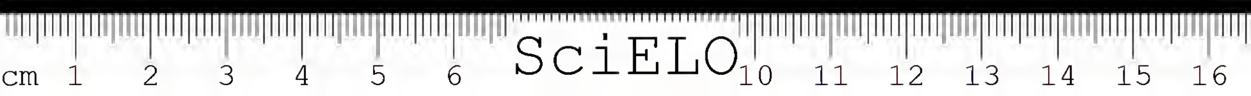







cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15 16


cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15


cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15 16


cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15

IMPRENSA OFICIAL DO ESTADO
SÃO PAULO — BRASIL
1975

